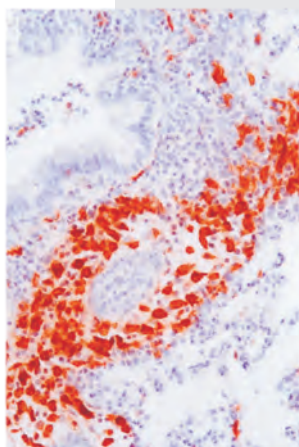


Akute Abstoßung experimenteller Lungentransplantate

—

Zeitverlauf der Infiltration durch Makrophagen, T- und B-Lymphozyten

ANDREE SCHMIDT



INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Akute Abstoßung experimenteller Lungentransplantate

—

Zeitverlauf der Infiltration durch Makrophagen, T- und B-Lymphozyten

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Andree Schmidt

aus Meschede

Gießen 2009

Aus dem Medizinischen Zentrum für Chirurgie, Anästhesiologie und
Urologie der Justus-Liebig-Universität Gießen
Abteilung für Allgemein-, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und
Kinderchirurgie
Abteilungsleiter: Herr Prof. Dr. med. Winfried Padberg
Sektion Experimentelle Chirurgie
Leitung: Frau Prof. Dr. rer. nat. Veronika Grau

Gutachter: Frau Prof. Dr. Grau

Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. Sachs

Tag der Disputation: 01.12.2009

*Meinem verstorbenen Großvater Walter
in Dankbarkeit gewidmet*

Inhalt

Seite

Inhalt.....	IV
Abkürzungen.....	VII

1 Einleitung

1.1	Klinische Lungentransplantation.....	1
1.2	Aufbau der Lunge.....	2
1.3	Leukozyten in der Lunge.....	4
1.4	Zerstörung vaskularisierter Organtransplantate.....	5
1.4.1	Alloantigenunabhängige Mechanismen.....	5
1.4.2	Alloantigenabhängige Mechanismen.....	6
1.4.3	Formen der Transplantatabstoßung.....	8
1.5	Monozyten/Makrophagen und dendritische Zellen.....	8
1.6	Studienrelevante Oberflächenantigene.....	10
1.7	Experimentelles Modell der akuten Lungentransplantat- abstoßung.....	11
1.8	Histopathologische Klassifikation der akuten Abstoßung von humanen Lungentransplantaten.....	12
1.9	Fragestellungen der Arbeit.....	14

2 Material und Methoden

2.1	Reagenzien, Materialien und Geräte.....	16
2.2	Tiere.....	20
2.3	Transplantation.....	21
2.4	Paraffinhistologie.....	23
2.4.1	Fixierung.....	23
2.4.2	Entwässerung und Einbettung.....	24

2.4.3	Silanisierung von Objektträgern.....	24
2.4.4	Herstellung der Schnitte.....	25
2.5	Immunhistochemische Untersuchungen.....	25
2.5.1	Puffer.....	28
2.5.2	Entparaffinieren.....	29
2.5.3	Antigendemaskierung.....	29
2.5.4	Primärantikörper.....	30
2.5.5	Inkubation mit dem Primärantikörper.....	30
2.5.6	Nachweis des gebundenen Primärantikörpers.....	30
2.5.7	Farbreaktion.....	31
2.5.8	Hämalaun- und Eosinfärbung	32
2.5.9	Entwässerung und Eindecken.....	33
2.6	Auswertung.....	33
3	Ergebnisse	
3.1	Histopathologische Veränderungen in Transplantaten	35
3.2	Transplantatinfiltration durch Leukozyten.....	38
3.2.1	ED1 ⁺ Monozyten/Makrophagen.....	38
3.2.2	ED2 ⁺ Makrophagen.....	41
3.2.3	R73 ⁺ T-Lymphozyten.....	44
3.2.4	Ox33 ⁺ B-Lymphozyten.....	47
3.3	Vergleich von Iso- und Allotransplantaten.....	50
3.4	Veränderungen der nativen rechten Empfängerlungen.....	51
4	Diskussion	
4.1	Diskussion von Material und Methoden.....	53
4.1.1	Konservierung und Transplantation der Lungen.....	53
4.1.2	Gewebehistologie und Auswertung.....	54
4.1.3	Antikörperauswahl.....	56

4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	57
4.2.1	Histopathologie.....	57
4.2.2	Transplantatinfiltration.....	59
4.2.2.1	ED1 ⁺ Monozyten/Makrophagen.....	59
4.2.2.2	ED2 ⁺ Makrophagen.....	60
4.2.2.3	R73 ⁺ T-Lymphozyten.....	60
4.2.2.4	Ox33 ⁺ B-Lymphozyten.....	61
4.2.3	Rechte Kontrolllungen.....	62
4.3	Schlussfolgerungen.....	63
5	Zusammenfassung	
5.1	Deutsch.....	64
5.2	Englisch.....	65
6	Verzeichnisse	
6.1	Literatur.....	67
6.2	Abbildungen.....	76
6.3	Tabellen.....	77
7	Anhang	
7.1	Danksagung.....	78
7.2	Ehrenwörtliche Erklärung.....	79
7.3	Lebenslauf.....	80
7.4	Veröffentlichung und Poster.....	81

Abkürzungen

Abkürzung	Erläuterung
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AM	Alveolarmakrophage
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALT	<i>bronchus associated lymphoid tissue</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cm	Zentimeter
°C	Grad Celsius
D	Deutschland
DAB	3,3´Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
d	Tag
DA	<i>Dark Agouti</i>
DC	dendritische Zellen
ED1	monoklonaler Antikörper (CD68-artig)
ED2	monoklonaler Antikörper (CD163)
et al.	und andere
g	Gramm
h	Stunde
HE	Hämatoxilin-Eosin
I.E.	internationale Einheiten
Ig	Immunglobulin
IM	Gewebemakrophage
i.v.	intravenös
Kap.	Kapitel
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LCA	<i>leukocyte common antigen</i>
LEW	<i>Lewis</i>

Abkürzung	Erläuterung
M/M	Monozyten/Makrophagen
mAb	monoklonaler Antikörper
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
NO	Stickstoffmonoxid
NRS	Normalrattenserum
o.g.	oben genannt
OT	Objektträger
Ox33	monoklonaler Antikörper (<i>leukocyte common antigen</i> CD45RA auf B-Zellen)
p.a.	für die Analyse
p.m.	für die Mikroskopie
p.s.	für die Synthese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PEEP	positiv endexpiratorischer Druck
PLP	Perjodat Lysin Paraformaldehyd
R73	monoklonarer Antikörper (α/β -Zell-Rezeptor)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
Tab.	Tabelle
TBS	<i>tris buffered saline</i>
T _C -Zellen	zytotoxische T-Zellen
T _H -Zellen	T-Helferzellen
TZR	T-Zell-Rezeptor
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Klinische Lungentransplantation

Die klinische Lungentransplantation hat sich in den letzten zwei Jahrzehnten zu einer adäquaten Therapieoption für Patienten mit einer Lungenerkrankung im Endstadium entwickelt. Trotzdem ist es notwendig, 55% der Transplantatempfänger innerhalb des 1. Jahres aufgrund akuter Abstoßungsreaktionen zu behandeln. Die Langzeitergebnisse sind mit einer 5-Jahresüberlebensrate von 51% vergleichsweise schlecht [13].

Die Sterblichkeit von Lungentransplantatempfängern ist während des 1. Jahres in hohem Maße abhängig von der Grunderkrankung und eventueller Begleiterkrankungen. Dennoch lassen sich Zeiträume definieren, in denen bestimmte postoperative Todesursachen vorherrschen (Tab. 1-1 und Abb. 1-1). Unter chirurgisch-technischem Aspekt sind die meisten humanen Transplantationen heute Routineoperationen. Die eigentlichen Probleme nach Organtransplantationen liegen in der Beherrschung von Komplikationen. Diese sind initial auf das primäre Transplantatversagen und im weiteren Verlauf auf Infektionen sowie die immunologische Auseinandersetzung des Empfängers mit dem Transplantat zurückzuführen [13].

Akute Abstoßungsreaktionen lassen sich durch eine wirksame Immunsuppression reduzieren. Vergleichsweise geringe Mortalitätsraten belegen die Wirksamkeit dieses Konzepts im kurz- bis mittelfristigen Verlauf. Die unter Immunsuppression erhöhte Gefahr für Infektionen bedingt jedoch eine hohe Mortalität (Tab. 1-1) [13]. Die vergleichsweise hohe Infektionsgefahr für Lungentransplantate begründet sich durch die notwendige Immunsuppression sowie die ständige Exposition gegenüber Umwelteinflüssen und Pathogenen. Um eine größtmögliche Immunsuppression bei reduzierten Nebenwirkungen zu erreichen, werden Kombinationstherapien durchgeführt [48, 90]. Wichtige Nebenwirkungen sind virale, bakterielle und mykotische Infektionen [13].

In verschiedenen Studien wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl akuter Transplantatabstoßungen und der Entwicklung einer chronischen Abstoßung beschrieben [13, 25]. Bei Lungentransplantatempfängern ist das Bronchiolitis obliterans Syndrom Ausdruck der chronischen

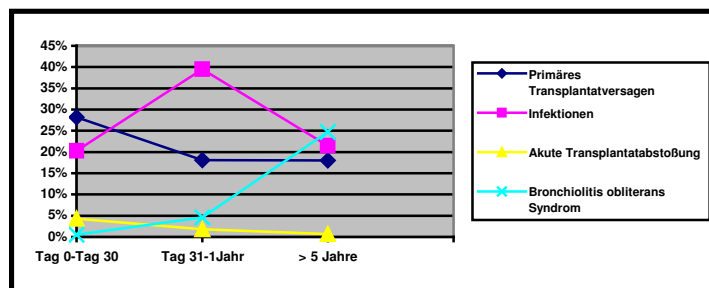
Transplantatabstoßung [53, 95]. Dieses beschreibt die klinischen Symptome der Bronchiolitis obliterans mit langsamem Funktionsverlust des Organs [7]. Hiervon sind 51% der Lungentransplantatempfänger nach 5 Jahren betroffen. Damit zählt das Bronchiolitis obliterans Syndrom neben Infektionen und dem Transplantatversagen zu den wichtigsten Langzeitkomplikationen mit Todesfolge nach Lungentransplantation [13, 85].

Ein besseres Verständnis der akuten Transplantatabstoßung, mit der Möglichkeit zur Entwicklung neuer Therapiestrategien, könnte damit neben den kurzfristigen Erfolgen auch einen wichtigen Beitrag zur Verbesserung der Langzeitprognose von Lungentransplantatempfängern leisten.

Tabelle 1-1 Todesursachen nach Lungentransplantation [13]

Ursache	Tag 0-Tag 30	Tag 31-1 Jahr	>5 Jahre
Transplantatversagen	28,2%	18,1%	18,0%
Infektionen	20,3%	39,5%	21,5%
Akute Transplantatabstoßung	4,3%	1,8%	0,7%
Bronchiolitis obliterans Syndrom	0,5%	4,6%	24,7%

Abbildung 1-1



Todesursachen nach Lungentransplantation [13]

1.2 Aufbau der Lunge

Die Lunge ist ein paariges Organ und gliedert sich in Lappen, Segmente, Subsegmente, Lobuli und Azini, die durch Bindegewebe zusammengefasst werden. Diese Aufteilung leitet sich von der dichotomen Verzweigung der Bronchien/Bronchiolen und parallel verlaufender Äste der aus dem rechten Ventrikel entspringenden Pulmonalarterie ab. Aus den Endaufzweigungen der Bronchien/Bronchiolen, den Bronchioli respiratorii, gehen die Ductus alveolares

hervor. Der venöse Rückfluss erfolgt segmentunabhängig in den interlobulären Septen über Äste der Pulmonalvene in den linken Herzvorhof. Neben diesem funktionellen Arbeitskreislauf (*Vasa publica*) bilden die aus der Aorta entspringenden Bronchialarterien den Ernährungskreislauf (*Vasa privata*). Sie begleiten die Bronchien bis zum Übergang in die Bronchiolen.

Es wird das luftleitende System der Bronchien/Bronchiolen sowie der alveoläre Bereich des Gasaustausches unterschieden. Die luftleitenden Abschnitte sind mit respiratorischem Epithel ausgekleidet. Dieses ist ein mehrreihiges Flimmerepithel mit Basal-, Flimmer-, und Becherzellen sowie helle Zellen, die dem APUD (*amine precursor uptake and decarboxilase*)-System zugeordnet werden. Letztere erfüllen endokrine Funktionen. Die Höhe des Flimmerepithels nimmt mit zunehmender Verästelung ab. Das Verhältnis Becher-/Flimmerzellen beträgt im oberen und mittleren Abschnitt des Bronchialsystems 1:4, nimmt jedoch in Richtung Bronchioli ab. Becherzellen enthalten apikal polysaccharidhaltige Vesikel, die nach Abgabe einen zusammenhängenden Film auf der Epitheloberfläche bilden.

Die Alveolen sind für den Gasaustausch entscheidende Abschnitte der Lunge. Sie liegen dicht aneinander, wobei benachbarte Alveolen gemeinsame Alveolarsepten ausbilden. Gesunde Alveolarsepten sind dünn und flexibel. Sie enthalten Alveolarporen (Kohnsche Poren). Jede Alveole wird von einem dichten aus der Pulmonalarterie entspringenden Kapillarnetz umgeben. Hier verschmelzen die Basallaminae der Gefäßendothelzellen und der Typ I Pneumozyten zu einer Basalmembran. Dies ist der entscheidende Abschnitt des Gasaustausches. Fibrozyten sowie kollagene, retikuläre und elastische Fasern bilden das alveoläre Stützgerüst. Funktionell entscheidend ist die kurze Diffusionsstrecke und die große Oberfläche.

Das Alveolardeckepithel wird von flachen Pneumozyten Typ I (ca. 97% der Oberfläche) und kubischen Pneumozyten Typ II (ca. 3% der Oberfläche) ausgekleidet. Pneumozyten Typ I gehen aus Pneumozyten Typ II hervor und werden auch als Deckzellen bezeichnet. Pneumozyten Typ II sind durch Mikrovilli auf der Oberfläche und Lamellenkörper im Zytoplasma gekennzeichnet. Sie produzieren *surfactant* (*surface active agent*) einen Protein-Phospholipidfilm, der wesentlich zur Herabsetzung der Oberflächenspannung der Lungenalveolen beiträgt. Er wird in den

Lamellenkörpern gespeichert und über Exozytose abgegeben. *Surfactant* wird laufend von Alveolarmakrophagen und Pneumozyten Typ I aufgenommen.

Die Lungenfunktion definiert sich aus Ventilation, Perfusion und Diffusion. Aus einer Störung einer oder mehrerer Komponenten kann eine respiratorische Insuffizienz resultieren [81, 6].

1.3 Leukozyten in der Lunge

Leukozyten lassen sich in verschiedenen Kompartimenten der Lunge nachweisen. Es wird zwischen dem intravaskulären Leukozytenpool, den Leukozyten der bronchialen Region und denen der alveolären Region unterschieden. Die bronchiale Region umfasst Bronchien, pulmonale und bronchiale Gefäße, Lymphgefäße sowie das Bindegewebe um diese Strukturen herum. Die alveoläre Region umfasst den Alveolarraum und die Alveolarsepten [60, 71]. Alveolarsepten sowie der alveoläre Raum werden im Folgenden als Lungengewebe bezeichnet. Bei verschiedenen Spezies findet sich das sogenannte BALT (*bronchus associated lymphoid tissue*). Es ist regelmäßig in der bronchialen Lamina propria von Rattenlungen zu finden [70]. In humanem Lungengewebe kann es im Kindes- und Jugendalter regelmäßig und im Erwachsenenalter nur noch in wenigen Ausnahmen nachgewiesen werden [3, 40]. Dem BALT wird eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Antigenen und Initiierung der Immunantwort zugeschrieben [102].

Die Qualität und Quantität der Zellpopulationen differiert in den Kompartimenten, dabei ist über das Ausmaß der Zellmigration zwischen den Kompartimenten wenig bekannt [101, 29, 71]. Untersuchungen an Ratten zeigten, dass Lymphozyten kontinuierlich im Organismus zirkulieren. Dabei ist die Anzahl in der Lunge abhängig von der Eintritts- und Austrittsrate und ihrem Schicksal während der Passage [108, 101].

Monozyten/Makrophagen (M/M), dendritische Zellen (DC) und Lymphozyten gehören zu den Hauptinitiatoren/-regulatoren der Immunantwort in der Lunge. Man unterscheidet intravasale Monozyten, Alveolarmakrophagen (AM), und Gewebemakrophagen/interstitielle Makrophagen (IM). Ihre Unterscheidung erfolgt aufgrund verschiedener Merkmale (Kap. 1.5 und 1.6). In dieser Studie wird unter anderem die zeitliche und örtliche Verteilung dieser Zellen während der akuten Transplantatabstoßung untersucht.

1.4 Zerstörung vaskularisierter Organtransplantate

1.4.1 Alloantigenunabhängige Mechanismen

Im Zeitraum zwischen Explantation und Implantation ist die Lunge vom Gasaustausch sowie von der Zufuhr energiereicher Substrate abgeschnitten. Weiterhin ist die effektive Eliminierung von Abbauprodukten gestört. Dadurch und während der Reperfusion des Transplantats wird das Lungengewebe geschädigt. Konservierungslösungen können die Einflüsse von Entnahme sowie Ischämie und Reperfusion und damit das Risiko für das primäre Transplantatversagen minimieren [54]. Hierfür werden vor allem Konservierungslösungen verwendet, deren Ionenzusammensetzung dem extrazellulären Milieu ähnelt. Die Einführung kaliumarmer Lösungen sowie der Zusatz ödemreduzierender und rheologisch wirksamer Substanzen wie Dextran, erbrachte einen Fortschritt bei der Prävention pulmonaler Ödeme [69, 55]. Weiterhin wurde in Studien nachgewiesen, dass durch die initiale Verringerung des physiologischen Reperfusionsdrucks um 50% für 10 Minuten, die Schädigung des Transplantats reduziert werden kann [52, 4].

Dennoch treten Ischämie-/Reperfusionsschäden bei Lungentransplantaten in den ersten 72 Stunden (h) nach Transplantation auf und können in ihrer vollen Ausprägung zum primären Transplantatversagen führen, dessen Pathophysiologie ist bisher nur ansatzweise aufgeklärt. Das klinische Szenario umfasst ein rasch auftretendes schweres Oxygenierungsproblem mit Lungenödem und verminderter Lungencompliance. Es führt häufig zu einem Multiorganversagen und tritt unabhängig von Alter, zugrundeliegender Lungenerkrankung, Art der Transplantation oder weiterer Faktoren auf. Es reicht von einer milden Form bis hin zum voll ausgeprägten ARDS (*acute respiratory distress syndrome*) [98, 56]. In der frühen, exsudativen Phase des ARDS kommt es in der Lunge zu multiplen Veränderungen. 1) Permeabilitätserhöhung des Kapillarendothels und Alveolarepithels. 2) Einstrom proteinreicher Flüssigkeit in das Interstitium und den Alveolarraum. 3) Erhöhung des pulmonalvaskulären Widerstands mit Umverteilung der pulmonalen Perfusion und resultierender pulmonaler Hypertonie. 4) Zunehmende alveoläre Instabilität mit der Ausbildung von Atelektasen. 5) Progrediente Störung des Ventilations-/Perfusionsverhältnisses mit Ausbildung eines erhöhten intrapulmonalen Rechts-Links-Shunts [107].

Diese initialen Schäden werden als Risikofaktoren für die akute und chronische Transplantatabstoßung diskutiert [28].

1.4.2 Alloantigenabhängige Mechanismen

Die akute Transplantatabstoßung ist ein multifaktorieller Prozess, der bisher nur in Ansätzen verstanden ist. Folgende Ausführungen beziehen sich auf die studienrelevante zelluläre Abstoßung mit Ausbildung von Leukozyteninfiltraten. Diese sind ein Charakteristikum der akuten Abstoßung allogener Transplantate [111]. Da die Gefäßendothelzellen des Transplantats die Grenzfläche zwischen Empfängerkreislauf und Spenderorgan darstellen, liegt eine Beteiligung dieser Zellart bei der Transplantatabstoßung nahe. Auf den Endothelzellen werden die sogenannten Transplantationsantigene exprimiert. Das macht diese Zellen zum direkten Ziel von gegen diese Antigene gerichteten Immunreaktionen. Eine bedeutende Rolle bei der Rekrutierung und Extravasation von Immunzellen wird impliziert [106].

Bei den Transplantations- oder Alloantigenen handelt es sich um Glykoproteine, die sich bei den einzelnen Individuen unterscheiden [49]. Sie werden als MHC (*major histocompatibility complex*)-Antigene bezeichnet, spielen eine Schlüsselrolle bei der Transplantatabstoßung und liefern den ersten Ansatz zur Fremderkennung [63, 73]. Man differenziert zwischen MHC Klasse-I- und MHC Klasse-II-Antigenen. Bei den MHC-Antigenen handelt es sich um Membranproteine mit extrazellulären Domänen die Peptidfragmente präsentieren können. Proinflammatorische Mediatoren können im Verlauf der Transplantatabstoßung die Expression von MHC-Antigenen hochregulieren. MHC I-Antigene befinden sich in unterschiedlichen Konzentrationen auf der Oberfläche von fast allen kernhaltigen Körperzellen sowie auf Thrombozyten. Sie gelten als die klassischen Transplantationsantigene, die der Eigenerkennung, aber auch als Zielstruktur bei der Fremderkennung dienen [49]. MHC II-Antigene sind im Wesentlichen auf antigenpräsentierenden Zellen (APZ) wie DC und M/M sowie auf B-Lymphozyten ausgeprägt, können aber unter inflammatorischen Bedingungen auf einer Vielzahl von Zellen, wie z.B. Gefäßendothelzellen [106], nachgewiesen werden.

Man unterscheidet die direkte und indirekte Fremderkennung. Bei der direkten Erkennung erfolgt die Antigenpräsentation durch gewebständige APZ des Spenders, die mittransplantiert werden. Die MHC-Antigene des Spenders

werden dabei von den Empfänger T-Zellen erkannt [63, 88]. Bei der indirekten Erkennung werden die Proteinstrukturen des Spenders von den APZ des Empfängers in die Zellen aufgenommen, dort zu Peptiden prozessiert und von MHC-Antigenen (Klasse I oder II) auf der Zelloberfläche von APZ des Empfängers präsentiert [49]. In beiden Fällen werden sie von einem antigenspezifischen T-Zell-Rezeptor (TZR) erkannt [63, 88, 33].

Durch diese Interaktion werden naive T-Zellen aus einem Ruhestadium in einen aktivierten Zustand versetzt, der durch Proliferation und Differenzierung gekennzeichnet ist. Es entstehen sowohl T-Effektorzellen als auch T-Gedächtniszellen [49]. Funktionell werden T-Zellen in Subpopulationen eingeteilt. Zytotoxische T-Zellen (Tc-Zellen) können die antigentragende Zelle zerstören. T-Helferzellen (T_H-Zellen) sezernieren verschiedene Mediatoren. Diese wirken auf Zellen des unspezifischen und spezifischen Abwehrsystems [86, 91].

Bei der Infiltration des Transplantates durch immunkompetente Zellen wie M/M und T-Zellen kommt es zur Produktion von verschiedenen pro- und antiinflammatorisch wirkenden Zytokinen, Mediatoren und Effektormolekülen [61, 11]. Auf diese soll im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden. Als wichtige Vertreter der Zytokine seien der Tumornekrosefaktor(TNF)- α , Interferon(IFN)- γ sowie Interleukin(IL)-1 β genannt. Diese können am Endothel die Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle steigern [77]. Als klassische Vermittler von Zell/Zellinteraktionen können Adhäsionsmoleküle den Leukozyten die Extravasation in das Gewebe ermöglichen [51]. Durch die gezielte Blockade von Adhäsionsmolekülen konnte die Leukozyteninfiltration von Transplantaten inhibiert und dadurch das Transplantatüberleben verlängert werden [87]. Chemokine und ihre Rezeptoren regulieren die Migration und Extravasation von Immunzellen und werden, basierend auf Struktur und Funktion, in vier Familien eingeteilt [11]. Unter Extravasation versteht man den Übertritt zirkulierender Leukozyten aus dem Blutstrom ins Gewebe. Dies geschieht in einer sequenziellen Kaskade molekularer Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothelzellen [10, 39]. Entscheidend ist hierfür der marginale Leukozytenpool in den Gefäßen [47, 104].

Aktivierte M/M und T-Lymphozyten bilden das, für die akute Abstoßungsreaktion charakteristische Leukozyteninfiltrat und sind an der Transplantaterstörung beteiligt [27, 96, 67, 24].

1.4.3 Formen der Transplantatabstoßung

Es gibt mehrere Einteilungen der Abstoßung. Klinisch werden zeitlich und funktionell differente Verläufe unterschieden. Im Einzelnen sind dies die hyperakute Abstoßung, die akute Abstoßung und die chronische Abstoßung.

Bei der hyperakuten Abstoßung kommt es innerhalb von Minuten zu Abstoßungsprozessen. Diese werden durch präformierte Empfängerantikörper gegen Spendergefäßendothelien ausgelöst. Die Antikörper aktivieren unter anderem die Komplement- und Blutgerinnungskaskade. Der daraus resultierende Gefäßverschluss durch Mikrothromben forciert das Absterben des transplantierten Gewebes. Durch den Nachweis von Antikörpern im Blut kann das Risiko für die hyperakute Abstoßung minimiert werden [15, 12].

Die akute Abstoßung beginnt meist innerhalb von Tagen bis Wochen. Diese zeichnet sich durch massive perivaskuläre Leukozyteninfiltrate und entzündliche Endothelschädigung aus [15]. Das Risiko für eine akute Transplantatabstoßung bleibt auch nach diesem Zeitraum bestehen. Eine Risikoreduktion kann durch eine adäquate Immunsuppression erreicht werden. Die chronische Abstoßung manifestiert sich in einem langsamen Funktionsverlust des Organs und ist in der Lunge histopathologisch durch eine fibroproliferative Obliteration der terminalen und respiratorischen Bronchiolen und durch den Umbau der Blutgefäße charakterisiert [7].

1.5 Monozyten/Makrophagen und dendritische Zellen

Monozyten sind weiße Blutzellen von 12-20 µm Durchmesser und einem großen, nicht segmentierten, meist gelappten Kern. Sie entstehen im Knochenmark über mehrere Zwischenstufen aus myeloischen Vorläuferzellen. Laut Definition sind Monozyten im Blut zirkulierende mononukleäre Phagozyten [45, 50]. Sobald Monozyten aufgrund verschiedener Stimuli wie Chemokine ins Gewebe migrieren, beginnt die Differenzierung zu Makrophagen und DC [76].

M/M und DC sind effiziente APZ, sie besitzen eine große Heterogenität und können anhand verschiedener Oberflächenantigene in Subpopulationen

unterteilt werden [z.B. 113, 34]. Diese unterscheiden sich mitunter erheblich bezüglich ihres Differenzierungsstadiums oder Aufenthaltsortes [26, 97].

DC sind spezialisierte APZ, die durch Aktivierung von T_H-Zellen effizient eine adaptive Immunantwort auslösen können [18, 92, 100]. Die Erneuerung der DC-Population in gesunden Lungen erfolgt unter anderem durch Monozyten [44, 43]. DC besitzen lange Zellfortsätze, in der vorliegenden Arbeit werden sie durch den monoklonalen Antikörper (mAb) ED1 erfasst, der gegen ein CD(*cluster of differentiation*)68-artiges Antigen gerichtet ist. Sie spielen jedoch bei der Auswertung des immunpositiven Flächenanteils aufgrund des geringen Flächenanteils quantitativ kaum eine Rolle.

M/M sind zur Zytotoxizität und Phagozytose befähigt. Sie können sowohl als APZ als auch als Effektorzellen tätig werden. Sie interagieren mit Zellen der spezifischen Immunantwort und erfüllen damit eine wichtige Brückenfunktion [76, 31, 62]. Nach Aktivierung können M/M pro- oder antiinflammatorische Eigenschaften aufweisen [31, 62].

Der hauptsächlich über T_H1-Zellen vermittelte Weg initiiert proinflammatorische Eigenschaften der Makrophagen (M1) und wird auch als klassische Aktivierung bezeichnet. M1-Makrophagen sind effektive Produzenten von Effektormolekülen wie Sauerstoffradikalen und Stickstoffmonoxid (NO). Sauerstoffradikale wie Hydrogenperoxid und Hydroxylradikale könnten zur Schädigung des Alveolar- und Bronchialepithels beitragen [54, 8, 105, 1]. Lokal hohe NO-Konzentrationen werden bei der Schädigung des Gefäßendothels diskutiert [5, 37]. Weiterhin werden zahlreiche Mediatoren mit proinflammatorischen und chemotaktischen Eigenschaften sezerniert [61, 17, 68, 38]. Diese spielen unter anderem eine Rolle bei der Extravasation von Leukozyten und damit bei der Entwicklung von Leukozyteninfiltraten (Kap. 1.4.2). Bei der T_H1-Antwort handelt es sich um eine zellvermittelte Immunreaktion mit Aktivierung von Makrophagen und Tc-Zellen [74, 75]. Die Fähigkeiten dieser Zellen lassen sie zu einer gefährlichen Waffe gegenüber körperfremden Geweben werden.

Der über T_H2-Zellen vermittelte Aktivierungsweg wirkt auf die Makrophagen (M2) tendenziell antiinflammatorisch und wird als eine Form von Deaktivierung verstanden [62, 30]. M2 wird als Synonym für verschiedene Formen der Makrophagenaktivierung gebraucht, die nicht der klassischen M1-Aktivierung entsprechen. M2-Makrophagen haben immunregulierende Funktionen [30],

weiterhin wirken sie angiogenetisch [111, 35, 89] sowie hemmend auf die Antigenpräsentation [75]. M2-Makrophagen könnte eine wichtige Funktion bei der Transplantatregeneration zukommen.

Die akute Transplantatabstoßung ist ein komplexer Prozess, an dem viele verschiedene Zelltypen, Mediatoren und Mechanismen beteiligt sind. Ein besseres Verständnis der destruktiven sowie protektiven Rolle von M/M bei diesen Vorgängen, könnte einen Beitrag zur Entwicklung neuer Therapiestrategien der Transplantatabstoßung leisten.

1.6 Studienrelevante Oberflächenantigene

Zellmembranprotein CD163

CD163 ist spezifisch für M/M und gehört zur Proteinfamilie der zysteinreichen Scavengerrezeptoren (SRCR) Gruppe B. Diese Proteine kommen vorwiegend auf Zellen des Immunsystems vor. Sie sind an der Entwicklung des Immunsystems und der Regulation der Immunantwort beteiligt [79]. CD163 der Ratte wird durch den mAb ED2 erkannt. Perivaskuläre/-bronchiale Makrophagen in gesunden Rattenlungen sind ED2⁺, während Monozyten, AM und DC ED2⁻ sind [19]. Die CD163-Expression erfolgt unter anderem durch die Reifung von Monozyten zu Makrophagen [9, 94, 41]. Da CD163 rasch von der Oberfläche von M/M verschwinden kann, wird diskutiert, dass es sich um eine Abspaltung (*shedding*) des CD163 von der Zelloberfläche handeln könnte [22]. CD163 fungiert als Rezeptor für Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexe und trägt zur Entgiftung des Körpers von oxidativ toxischem Hämoglobin bei [58]. Weiterhin wird eine antiinflammatorische Wirkung auf Makrophagen beschrieben [65].

Lysosomales Membranprotein CD68-artig

Beim CD68-artigen lysosomalen Membranprotein handelt es sich um ein Antigen, das stark auf lysosomalen Membranen und schwach auf Zellmembranen myeloider Rattenzellen exprimiert wird. Im Einzelnen ist es bei der Mehrzahl von Vorläuferzellen im Knochenmark, intravasalen Monozyten, AM und schwach in peripheren Granulozyten und DC nachweisbar. Es soll Ähnlichkeiten zum humanen Glykoprotein CD68 aufweisen und wird durch den mAb ED1 erkannt. Oben genannte Zelltypen sind in gesunden Rattenlungen

ED1⁺, während perivaskuläre/-bronchiale Makrophagen ED1⁻ sind [16, 19]. Eine Beteiligung dieses Antigens am lysosomalen Metabolismus sowie bei Zell/Zell- und Zell/Pathogeninteraktionen wird diskutiert [2].

α/β-TZR

Man unterscheidet T-Lymphozyten mit einem polymorphen Antigenrezeptor aus α- und β-Ketten sowie T-Lymphozyten mit polymorphen Antigenrezeptor aus γ- und δ-Ketten [49]. In der vorliegenden Studie wird bei der T-Zelldetektion der mAb R73 gegen den α/β-TZR (konstante Region der β-Kette) verwendet [46], somit werden γ/δ-T-Lymphozyten nicht erfasst.

LCA (*leukocyte common antigen*) CD45RA

Bei CD45 handelt es sich um ein Glykoprotein der Zelloberfläche aller Zellen blutbildenden Ursprungs außer Erythrozyten, das als Tyrosinphosphatase fungiert. Es kommt in verschiedenen Isoformen vor. In der vorliegenden Studie wird CD45RA (LCA vom B-Zell-Typ) reifer B-Lymphozyten (außer Plasmazellen) durch den mAb Ox33 erkannt [110].

1.7 Experimentelles Modell der akuten Lungentransplantatabstoßung

Untersuchungen an humanen Lungen beschränken sich häufig auf die Zellen des bronchoalveolären Raumes, die durch eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) gewonnen werden, sowie auf Lungengewebe, das nach operativen Eingriffen oder Obduktionen zur Verfügung steht. Diese Untersuchungen können die Pathophysiologie der Transplantatabstoßung nur unzureichend beschreiben. Des Weiteren sind die Erkenntnisse über die durch BAL gewonnenen Zellen nur bedingt auf die Verhältnisse des gesamten Transplantats zu übertragen. Stark adhärente intraalveoläre Zellen sowie im Gewebe befindliche Zellen werden nicht erfasst.

Um das multifaktorielle Geschehen der akuten Transplantatabstoßung zu erforschen, bieten sich allogene Tiermodelle an. Hierbei können *in vitro* gewonnene Erkenntnisse in einem komplexen immunologischen Umfeld, ohne äußere Beeinflussung z.B. durch Immunsuppressiva, *in vivo* überprüft werden.

Ratten aus genetisch weitgehend homogenen Inzuchtstämmen eignen sich für die Transplantation vaskularisierter Organe.

Bei dem hier gewählten Tiermodell werden linke Lungen orthotop transplantiert (Kap. 2.3). Die Untersuchungen werden an männlichen Inzuchtratten der Stämme *Lewis* (LEW RT1^l) und *Dark Agouti* (DA RT1^{av1}) durchgeführt. Zur Kontrolle werden Lungen zwischen LEW-Tieren isogen transplantiert (isogene Kontrollgruppe), um die durch die Operation ausgelösten Veränderungen von den abstoßungsbedingten Veränderungen in der allogenen Gruppe (Abstoßungsgruppe) zu unterscheiden. Weiterhin werden die nativen rechten Empfängerlungen als Kontrollen ausgewertet.

Der Zeitverlauf der histopathologischen Veränderungen sowie der Zellinfiltration ist bisher für DA→LEW Lungentransplantate noch nicht beschrieben worden.

1.8 Histopathologische Klassifikation der akuten Abstoßung von humanen Lungentransplantaten

Im Jahre 1990 wurde ein internationales Klassifikationsschema für die akute Lungentransplantatabstoßung von der *International Society for Heart and Lung Transplantation* (ISHLT) eingeführt. Ab 1995 erfolgte die Modifikation dieser Klassifikation in Form der *Revised working formulation for classification and grading of lung allograft rejection* [112]. Dabei werden histopathologische Veränderungen bei 40 x Vergrößerung des Mikroskops beurteilt.

Zusammengefasst basiert die Klassifikation auf der Ausprägung perivaskulärer, septaler und intraalveolärer Infiltrate. Dabei wird das Vorhandensein von akuten Abstoßungsreaktionen beurteilt und in die Stadien A0 (keine), A1 (minimal), A2 (mild), A3 (moderat), A4 (heftig) unterteilt (Tab. 2-12) [112]. Ein weiterer Aspekt ist die begleitende Atemwegsentszündung, wobei analog in die Stadien B0 (keine), B1 (minimal), B2 (mild), B3 (moderat), B4 (heftig) und Bx (nicht auswertbar) unterteilt wird (Tab. 1-12) [112].

Seit 2007 ist eine aktualisierte Version, die *Revision of the 1996 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of lung rejection* [93] durch die ISHLT anerkannt. Bezüglich der Atemwegsentszündung ist die seit 1996 gebräuchliche Klassifikation unter der Berücksichtigung neuer Forschungsergebnisse sowie aus Praktikabilitätsgründen in der Weise geändert worden, dass die Stadien B1 und B2 (1996) unter dem Stadium B1R (low

grade) und die Stadien B3 und B4 (1996) unter dem Stadium B2R (high grade) zusammengefasst werden [93].

Tabelle 1-2 **Kurzfassung** der *Revised working formulation for classification and grading of lung allograft rejection* [112] für die akute Abstoßung bei 40 x Mikroskopvergrößerung

Stadium	Histopathologische Merkmale
A0 (keine)	- Keine mononukleären Leukozytenanhäufungen, Hämorrhagien oder Nekrosen nachweisbar.
A1 (minimal)	- Vereinzelte Blutgefäße, insbesondere Venulen sind von einem, 2-3 Zellschichten dicken, in der perivaskulären Adventitia lokalisierten Ring mononukleärer Leukozyten umgeben.
A2 (mild)	- Regelmäßiges, perivaskulär/subendothelial bei Venulen und Arteriolen nachweisbares mononukleäres Infiltrat - Assoziierte hyperplastische Veränderungen des Endothels (Endothelitis) - Ausbreitung von Leukozyten in perivaskuläre Bereiche, jedoch keine Infiltration von mononukleären Leukozyten in alveoläre Septen oder den Alveolarraum - Ein einzelnes, signifikantes, perivaskulär lokalisiertes, mononukleäres Infiltrat rechtfertigt die Diagnose A2.
A3 (moderat)	- Dichte, perivaskuläre Manschetten mononukleärer Leukozyten um die Venulen und Arteriolen - Assoziierte Endothelitis - Ausbreitung des Zellinfiltrats in die alveolären Septen und den Alveolarraum - Im Alveolarraum lassen sich vermehrt Alveolarmakrophagen nachweisen.
A4 (heftig)	- Diffuses, perivaskuläres, intraalveoläres und septales Infiltrat mononukleärer Leukozyten - Ausgeprägter Pneumozytenschaden - Assoziierte Makrophagen und neutrophile Granulozyten - Eventuell bestehen Gewebenekrosen, Hämorrhagien und eine nekrotisierende Vaskulitis.

Fortsetzung Tabelle 1-2

Stadium	Histopathologische Merkmale
---------	-----------------------------

Atemwegsentzündungen

- | | |
|---------------------|--|
| B0 (keine) | - Keine Atemwegsentzündungen. |
| B1 (minimal) | - Diffus verteilte, mononukleäre Leukozyten in der Submukosa von Bronchien und Bronchiolen. |
| B2 (mild) | - Dichte Manschetten mononukleärer Leukozyten und gelegentlich eosinophile Zellen in der Submukosa von Bronchien und Bronchiolen
- Unabhängig davon Epithelzellnekrosen/-apoptosen. |
| B3 (moderat) | - Dichte Manschetten mononukleärer Leukozyten, Lymphozyten und eosinophiler Granulozyten in der Lamina propria von Bronchien und Bronchiolen
- Unabhängig davon Epithelzellnekrosen/-apoptosen. |
| B4 (heftig) | - Dichte Manschetten mononukleärer Leukozyten, Lymphozyten und eosinophiler Zellen in der Lamina propria von Bronchien und Bronchiolen
- Gleichzeitige Ablösung der Epithelzellschicht von der Basalmembran
- Epitheliale Ulzerationen und fibrinöse Exudate mit Nachweis neutrophiler Granulozyten sowie Epithelzellnekrosen. |
| Bx | - Nicht auswertbar. |

1.9 Fragestellungen der Arbeit

M/M übernehmen als APZ und Effektorzellen wichtige Funktionen bei der unspezifischen und spezifischen Immunantwort. Sie verfügen über proinflammatorische und zytotoxische Eigenschaften, die in großem Umfang zur Transplantatzerstörung beitragen können. Sie können andererseits antiinflammatorisch und geweberegenerativ wirken und erfüllen wichtige Funktionen bei der Reorganisation geschädigter Gewebe. Damit bieten sie einen vielversprechenden Ansatzpunkt zur Entwicklung neuer Therapien der akuten Transplantatabstoßung.

Die Untersuchungen sollen eine Grundlage für die histopathologische Beurteilung experimenteller Lungentransplantate schaffen und dienen damit als Vorarbeit für zukünftige therapeutische Studien.

Es wird der Zeitverlauf der Infiltration allogener und isogener Rattenlungentransplantate durch mononukleäre Leukozyten untersucht. Dabei wird ein besonderes Augenmerk auf M/M gelegt.

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

1. Welche histopathologischen Veränderungen manifestieren sich bei isogenen und allogenen Rattenlungentransplantaten bis zum 6. postoperativen Tag? Welche Veränderungen sind auf perioperative Schäden zurückzuführen, welche auf Abstoßungsreaktionen?
2. Wie erfolgt die Transplantatinfiltration durch Monozyten/Makrophagen, B- und T-Lymphozyten bei isogenen und allogenen Rattenlungen bis zum 6. postoperativen Tag? Welche Unterschiede ergeben sich im Hinblick auf die verschiedenen Kompartimente der Rattenlunge?

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien, Materialien und Geräte

Tabelle 2-1 Reagenzien (alphabetisch)

Reagenzien	Hersteller	Bestell.Nr.
Aceton für die Analyse (p.a.) (C ₃ H ₆ O) M= 58,08 g/mol	Merck, Darmstadt, Deutschland (D)	100014
Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat p.a. KAl(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O M= 474,39 g/mol	Merck, Darmstadt, D	101047
Avidin	Sigma, Taufkirchen, D	A-9275
Biotin	Sigma, Taufkirchen, D	B-4501
Bovines Serumalbumin	Serva, Heidelberg, D	11930
Chloralhydrat (C ₂ H ₃ Cl ₃ O ₂) M= 165,40 g/mol	Merck, Darmstadt, D	102425
Citronensäure-Monohydrat p.a. (C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O) M= 210,14 g/mol	Merck, Darmstadt, D	100244
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat p.a. (Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O) M= 177,99 g/mol	Merck, Darmstadt, D	106580
EnVision™mouse Peroxidase	Dako, Carpinteria, USA	K 4000
Eosin G p.m. (C ₂₀ H ₆ Br ₄ Na ₂ O ₅) M= 691,86 g/mol	Merck, Darmstadt, D	115935
Essigsäure 100% (Eisessig) für die Synthese (p.s.) (C ₂ H ₄ O ₂) M= 60,05 g/mol	Merck, Darmstadt, D	818755
Ethanol absolut p.a. (C ₂ H ₆ O) M= 46,07 g/mol	Merck, Darmstadt, D	100983
Hämatoxylin-Monohydrat für die Mikroskopie (p.m.) (C ₁₆ H ₁₄ O ₆ ·H ₂ O) M= 320,29 g/mol	Merck, Darmstadt, D	115938
Isopropanol p.a. (2-Propanol) (C ₃ H ₈ O) M= 60,10 g/mol	Riedel-de Haën, Seelze, D	24137

Fortsetzung Tabelle 2-1 Reagenzien

Reagenzien	Hersteller	Bestell-Nr.
Kaliumchlorid p.a. (KCl) M= 74,56 g/mol	Roth, Karlsruhe, D	6781.1
Kaliumdihydrogenphosphat p.a. (KH ₂ PO ₄) M= 136,09 g/mol	Merck, Darmstadt, D	104873
L-Lysin (C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂ ·HCL) M= 182,7 g/mol	Serva, Heidelberg, D	28220
Methylbenzoat (Benzosäure-Methylester) p.m. (C ₈ H ₈ O ₂) M= 136,2 g/mol	Roth, Karlsruhe, D	6944.2
Natrium-Azid p.a. (NaN ₃) M= 65,01 g/mol	Baker, Deventer, Niederlande	97167
Natriumchlorid p.a. (NaCl) M= 58,44 g/mol	Riedel-de Haën, Seelze, D	31434
Natriumdihydrogenphosphat p.a. (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O) M= 137,99 g/mol	Baker, Deventer, Niederlande	0303
Natriumhypochloritlösung (6 - 14 % aktives Chlor)	Merck, Darmstadt, D	105614
Natrium m-Perjodat (NaIO ₄) M= 213,9 g/mol	Sigma, Taufkirchen, D	S-1878
Natriumiodat p.a. (NaIO ₃) M= 197,89 g/mol	Merck, Darmstadt, D	106525
Natronlauge (NaOH) = 1 mol/l (1 N)	Merck, Darmstadt, D	109137
Paraformaldehyd reinst (HO[CH ₂ O] _n H)	Merck, Darmstadt, D	104005
Phenylhydrazin p.s. (C ₆ H ₈ N ₂) M= 108,14 g/mol	Merck, Darmstadt, D	807250
Primärantikörper ED1, ED2, R73, Ox33	Serotec, via Camon, Wiesbaden, D	
Protease Typ XIV vom Streptomyces griseus	Sigma, Taufkirchen, D	P-5147
Salzsäure (HCl) = 1 mol/l (1 N)	Merck, Darmstadt, D	109057
(HCl) = 2 mol/l (2 N)	Merck, Darmstadt, D	109063

Fortsetzung Tabelle 2-1 Reagenzien

Reagenzien	Hersteller	Bestell-Nr.
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan p.a. (C ₄ H ₁₁ NO ₃) M= 121,14 g/mol	Roth, Karlsruhe, D	4855.2
Vectastain ABC-Kit Elite, IgG mouse	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA via Camon, Wiesbaden, D	PK-6102
Wasserstoffperoxid 30% p.a. (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt, D	107209
Xylol reinst (C ₈ H ₁₀) M= 106,17 g/mol	Merck, Darmstadt, D	108685
3-Aminopropyl-Triethoxysilane (C ₉ H ₂₃ NO ₃ Si)	Sigma, Taufkirchen, D	A-3648
3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid	Sigma, Taufkirchen, D	D-5905

Tabelle 2-2 Materialien (alphabetisch)

Materialien	Hersteller	Bestell.-Nr.
„Anastomosen-cuff“ Abbocath® 16 GA x 51 mm (modifizierter i.v. Katheter)	Abbott, Sligo, Irland	89792VM
„Beatmungstubus“ Insyte® 14 GA x 45 mm (modifizierter i.v. Katheter)	Beckton/Dickinson, Sandy, USA	381267
Hydrophober Stift	Immunotech, Marseille, F PAP-Pen	1056
Nahtmaterial		
Monosof®	9-0 USS DG, Norwalk, USA	N-2533
Premilene®	8-0 Braun Aesculap AG, Tuttlingen, D	G0090702
Seide „E“ geflochten	6-0 Resorba, Nürnberg, D	41517
Vicryl®	4-0 Ethicon, St. Stevens-Woluwe, Belgien	V292H
Haushalts-Nähgarn		
Objektträger	Mariefeld, D	1000200
Paraplast (Paraffin)	Sherwood medical, St.Louis, USA	8889-501007
Pasteurpipette	Volac, J.Paulten Ltd., Barking, Großbritannien	D 810

Fortsetzung Tabelle 2-2 Materialien

Material	Hersteller	Bestell-Nr.
Reaktionsgefäße 0,6 ml	Sarstedt, Nürnberg, D	72.699
1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, D	0030 102.002
2 ml	Eppendorf, Hamburg, D	0030 102.094

Tabelle 2-3 Medikamente (alphabetisch)

Medikament	Hersteller
Ampicillin-ratiopharm® 0,5 (Ampicillin-Natrium 0,53 g Trockensubstanz)	Ratiopharm GmbH, Ulm, D
Antisedan® (Atipamezolhydrochlorid) 5 mg/ml	Pfizer GmbH, Karlsruhe, D
Atropinsulfat® (Atropinsulfat) 0,5 mg/ml	Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Domitor® (Medetomidinhydrochlorid) 1 mg/ml	Pfizer GmbH, Karlsruhe, D
Forene® (Isofluran)	Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden, D
Heparin-ratiopharm® (Heparin-Natrium) 5000 IE/ml	Ratiopharm GmbH, Ulm, D
Isotone Kochsalzlösung 0,9%	Braun, Melsungen, D
Ketavet® (Ketaminhydrochlorid) 100 mg/ml	Pharmacia GmbH, Erlangen, D

Tabelle 2-4 Geräte (alphabetisch)

Geräte	Hersteller	Typ
Autoklav	Webeco, Bad Schwartau, D	Automat 12 / 38
Durchlichtmikroskop	Olympus, Hamburg, D	BX51TF
Digitalkamera	Olympus, Hamburg, D	CC-12
Feinwaage	Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz	Delta Range
Einbettautomat	Shandon, Frankfurt 50, D	Citadel 1000

Fortsetzung Tabelle 2-4 Geräte

Geräte	Hersteller	Typ
Heizplatte	Störk-Tronic, D	Präzitherm 28-1
Mikrotom	Jung, Bensheim, D	2065 Supercut
Magnetrührgerät mit Heizung	IDL, Nidderau, D	Mec 11
pH-Messgerät	Schott, Hofheim, D	CG 840
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, D	div. Größen
Beatmungsgerät für Ratten (rodent ventilator)	Harvard, Holliston, USA	Modell 683
Streckbecken	GfL, Burgwedel, D	Typ 1052
Wärmeschrank	Heraeus Instruments, Hanau, D	UT 6120
Waage	Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz	Delta Range PM 480
Wasseraufbereitungsanlage	ELGA Labwater, Siershahn, D	Elgastat Maxima
Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen, D	EBA 21

2.2 Tiere

Die Untersuchungen werden an männlichen Inzuchtratten mit einem Körpergewicht (KG) von 200-300 g, der Stämme LEW(RT1^l) und DA(RT1^{av1}) durchgeführt. Die Tiere werden von Elevage Janvier, Le Genest-St-Isle, Frankreich bezogen und unter spezifiziert pathogenfreien Bedingungen gehalten. Erwachsene männliche LEW-Ratten dienen generell als Transplantatempfänger. Bei allogenen Transplantationen werden DA-Ratten als Spender eingesetzt und als Abstoßungsgruppe definiert. Bei isogenen Transplantationen werden LEW-Ratten als Spender eingesetzt und als isogene Kontrollgruppe definiert.

Eine Tierversuchsgenehmigung gemäß § 8 Absatz 1 des deutschen Tierschutzgesetzes mit der Nummer II25.3-19c20-15(1)MR20/26 wurde am 25.07.2001 erteilt.

2.3 Transplantation

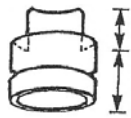
Die linksseitigen Transplantationen erfolgen durch Frau Prof. Dr. V. Grau nach der Technik von Mizuta [64] und unterteilen sich in die Explantation der linken Donorlunge und die orthotope Implantation in das Empfängertier.

Als Prämedikation werden Spender- und Empfängertiere zunächst mit Forene® (Isofluran) vornarkotisiert, bevor eine intramuskuläre Injektion von Atropinsulfat (Atropinsulfat 0,25 mg/kg KG) erfolgt. Zur definitiven Narkoseeinleitung wird Ketavet® (Ketaminhydrochlorid 90 mg/kg KG) und Domitor® (Medetomidinhydrochlorid 0,1 mg/kg KG) mit isotoner Kochsalzlösung auf 500 µl aufgefüllt und intraperitoneal injiziert.

In der ersten Operationsphase erfolgt bei dem Spendertier die Desinfektion des OP-Bereichs mit Isopropanol 70%. Heparin-Natrium (1000 IE/kg KG) wird intravenös (i.v.) in die Vena dorsalis penis appliziert und ein Hautschnitt vom Abdomen bis cranial des Jugulums gelegt. Nachdem die Trachea dargestellt ist, erfolgt die Intubation über eine Tracheotomie. Als Beatmungstubus wird ein i.v. Katheter (Insyte® 14 GA 45 mm) eingesetzt. Die Beatmung wird mit einem Beatmungsgerät für Ratten mit einer Frequenz von 100 Atemzügen/Minute (min) und einem Atemzugvolumen von 1 ml/100 g KG durchgeführt. Der positive endexpiratorische Druck (PEEP) beträgt 5 cm Wassersäule. Nach Eröffnung des Zwerchfells und medianer Sternotomie wird der Thorax vorsichtig, unter Belastung der unteren Thoraxapertur, gespreizt und der Thymus wegpräpariert. Anschließend werden die Aorta abdominalis und Vena cava inferior eröffnet. Über den rechten Ventrikel und den Truncus pulmonalis erfolgt die Perfusion mit 20 ml kalter isotoner Kochsalzlösung. Dabei wird blasenfrei und mit einem Druck von 20 cm Wassersäule, über etwa 2 min perfundiert. Der Abfluss erfolgt über das zuvor abgeschnittene linke Herzohr. Die Trachea wird in Inspirationsstellung durch eine Ligatur verschlossen und der Herz-Lungenblock, nach Präparation der umliegenden Strukturen, durch leichten Zug abgehoben. Schließlich wird die Aorta herznah abgesetzt, der Ösophagus entfernt und der Organblock in eine Petrischale mit isotoner Kochsalzlösung gelegt. Unter dem Operationsmikroskop erfolgt nun die Präparation der linken Hilumregion. Die Arteria und Vena pulmonalis sowie der Bronchus werden dargestellt. Nahe der Carina wird nun der linke Stammbronchus mit Haushalts-Nähgarn ligiert und proximal abgesetzt. Nun

werden Arteria und Vena pulmonalis mit *cuffs* versehen. Als *cuff* (Abb. 2-1) dient ein modifizierter i.v. Katheter (Abbocath® 16 GA x 51 mm).

Abbildung 2-1



Griff (1mm)

Hauptteil (1mm)

Die Abbildung zeigt den im Text beschriebenen *cuff*. Dieser besteht aus einem 1 mm langen Hauptteil und einem 1 mm langen Griff, der ca. ¼ des Katheterumfangs in der Breite misst. Am Hauptteil befindet sich eine Rinne. (Abbildung geändert nach Mizuta [64])

Das jeweilige Gefäß wird durch den *cuff* gezogen, die Gefäßwand umgestülpt und mit einer Ligatur (Premilene® 8-0) über der Rinne im Hauptteil fixiert.

Im zweiten Operationsabschnitt erfolgt die Atropinsulfatgabe und Narkose des Empfängertiers wie eingangs beschrieben. Das Tier wird intubiert, rechtsseitig gelagert und die linke Thoraxhälfte nach der Rasur mit Isopropanol 70% desinfiziert. Die Thorakotomie erfolgt durch den Musculus latissimus dorsi, einen halben Querfinger kaudal des Angulus inferior scapulae. Der Musculus trapezius und der Musculus serratus anterior werden vorsichtig mobilisiert, wobei der Musculus serratus unterfahren und nach ventral durchtrennt wird. Im 4. oder 5. Interkostalraum wird ein Spreizer (Lidspreizer) eingesetzt und die Lunge mittels Wattestäbchen aus dem Thorax nach dorsal gezogen. Unter dem Operationsmikroskop wird der Hilumbereich stumpf präpariert. Dabei erfolgt die Darstellung der Arteria und Vena pulmonalis sowie des Stammbronchus. Zunächst wird der Bronchus ligiert und hilumnah abgesetzt, dann erfolgt die Ligatur der Arteria pulmonalis und anschließend der Vena pulmonalis. Im nächsten Schritt werden die Gefäße über eine kleine Längsinzision eröffnet, mit isotoner Kochsalzlösung gespült und die vorbereiteten *cuffs* des Spenderorgans eingeführt. Die Befestigung erfolgt durch eine jeweils vorgelegte Ligatur (Seide "E" geflochten 6-0). Der Griff der *cuffs* und die linke Empfängerlunge werden entfernt. Anschließend erfolgt die Bronchusanastomose, bei der zuerst die Paries membranacea und dann der kartilaginäre Bronchusteil fortlaufend genäht wird (Monosof® 9-0). Abschließend wird die Lunge reventiliert, reperfundiert und vorsichtig in die Pleurahöhle geschoben. Vor dem Verschluss der Thoraxwand wird ein mit Löchern versehener Silikonschlauch

(Durchmesser 1 mm) als Drainage in den Thoraxraum eingelegt. Die Lunge wird durch Abklemmen der Ausatemluft kurzzeitig gebläht. Dann erfolgt der dreischichtige Verschluss mittels resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl® 4-0). Nach der Muskelnahrt kann vorsichtig Sog auf die Drainage gegeben und der PEEP auf 1 cm Wassersäule reduziert werden. Am Ende der Operation wird dem Tier zur Narkotikaantagonisierung Antisedan® (Atipamezolhydrochlorid 0,5 mg/kg KG) injiziert und nach dem Wiedereinsetzen der Spontanatmung die Drainage entfernt. Die maximale warme Ischämiezeit der Organtransplantate beträgt 22 min, die kalte Ischämie unter 20 min.

2.4 Paraffinhistologie

Die Tiere werden per inhalationem mit Forene® (Isofluran) getötet und die Lungen entnommen. Anschließend werden diese transversal im Abstand von 2-3 mm zerteilt und in das Fixans gegeben.

2.4.1 Fixierung

Gepufferte Paraformaldehyd-Lösung

1. 4 g Paraformaldehyd reinst ($\text{HO}[\text{CH}_2\text{O}]_n\text{H}$)
+ 50 ml Aqua reinst
+ 2 Tropfen 1 M Natronlauge (NaOH)
2. Erhitzen auf Magnetührgerät mit Heizung, bis die Lösung klar ist
3. Zugabe von 50 ml 2x konzentriertem Sørensenpuffer (Kap. 2.5.1.4)
4. Abschließend wird das Fixans auf Eis abgekühlt und der pH-Wert mit einem Indikatorstäbchen überprüft; gewünschter Bereich pH 7,3.

Perjodat-Lysin-Paraformaldehyd-Lösung (PLP)

Lösung A:

1. 2 g Paraformaldehyd reinst ($\text{HO}[\text{CH}_2\text{O}]_n\text{H}$)
+ 50 ml Aqua reinst
+ 2 Tropfen 1 M Natronlauge (NaOH)
2. Erhitzen auf Magnetührgerät mit Heizung, bis Lösung A klar ist
3. Abkühlen der Lösung auf Eis

Lösung B:

4. 0,214 g Natrium m-Perjodat (NaIO_4)
+ 1,37 g L-Lysin ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\cdot\text{HCl}$)
+ 50 ml Aqua reinst
5. Anschließend werden Lösungen A und B zusammengegeben.

2.4.2 Entwässerung und Einbettung

Nach der Fixierung werden die Gewebestücke zunächst in Sørensenpuffer (Kap. 2.5.1) gewaschen und anschließend in Alkohol überführt. In 70% Isopropanol ist es möglich, die Präparate länger zu lagern. Zum Einbetten werden die fixierten Präparate, aus 70% Isopropanol, in 90% Isopropanol überführt. In einem Einbettautomaten erfolgt nun, über einen Zeitraum von 13,5 Stunden (h), die Entwässerung der Präparate. Als Intermedium verwenden wir Methylbenzoat (Benzosäure-Methylester). Abschließend folgen zwei Einbettschritte in Paraffin (Paraplast). Tabelle 2-5 veranschaulicht den gesamten Fixier- und Einbettvorgang.

Tabelle 2-5 Einbettung

Zeit		Reagenz	Temperatur	Konzentration
24	h	Fixans	4 °C	
24	h	Sørensenpuffer	4 °C	
0,5	h	Isopropanol	4 °C	50%
> 24	h	Isopropanol	4 °C	70%
<u>Einbettautomat:</u>				
2,0	h	Isopropanol	18 °C	90%
1,0	h	Isopropanol	18 °C	90%
1,5	h	Isopropanol	18 °C	100%
1,5	h	Isopropanol	18 °C	100%
1,5	h	Isopropanol	18 °C	100%
2,0	h	Methylbenzoat	18 °C	100%
2,0	h	Methylbenzoat	18 °C	100%
2,0	h	Methylbenzoat	18 °C	100%
3,0	h	Paraplast	57 °C	100%
3,0	h	Paraplast	57 °C	100%

2.4.3 Silanisieren von Objektträgern

Zur Beschichtung der Objektträger (OT) verwenden wir 3-Aminopropyl-Triethylsilane. Vor dem Silanisieren müssen die OT sorgfältig in Salzsäure, Wasser und Alkohol gereinigt werden.

Tabelle 2-6 Silanisieren

Zeit		Lösung
12	h	5% Salzsäure
5	min	Aqua reinst
5	min	Ethanol absolut
		Bei Raumtemperatur (RT) trocknen lassen
5	min	2% 3-Aminopropyl-Triethylsilane in Aceton
5	min	2% Aceton in Aqua reinst
5	min	2% Aceton in Aqua reinst
5	min	Aqua reinst
1	h	Wärmeschrank bei 100 °C

2.4.4 Herstellung der Schnitte

Mit einem Mikrotom werden aus den eingebetteten Geweben 6 µm dicke Schnitte hergestellt und zum Glätten in ein geheiztes Wasserbecken (40 °C) gegeben. Nach einigen min werden die Schnitte auf silanisierte OT aufgebracht und zum Trocknen auf eine geheizte Platte (40 °C) gelegt. Abschließend werden die OT für 14-16 h in einen Wärmeschrank (60 °C) getrocknet.

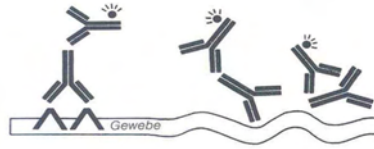
2.5 Immunhistochemische Untersuchungen

Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über den Versuchsablauf und über die Notwendigkeit einzelner Schritte gegeben. Nähere Angaben zum Ablauf der Untersuchungen folgen im Anschluss.

Der spezifische Nachweis von Antigenen auf histologischen Schnitten erfolgt mittels immunhistochemischer Färbung (Abb. 2-2). Die Antigene sind auf Paraffinschnitten meist schlecht zugänglich, sodass zunächst eine Entparaffinierung erfolgt (Kap. 2.5.2). Die Antigendemaskierung erfolgt durch Autoklavieren oder Enzymverdau (Kap. 2.5.3). Im 1. Schritt bindet ein unmarkierter Primärantikörper am Antigen. Dieser Antikörper wird im 2. Schritt von Sekundärantikörpern erkannt, die mit Peroxidasemolekülen verbunden sind. Die Peroxidasemoleküle werden in einem 3. Schritt durch eine Enzym-Substrat-Reaktion, bei der ein wasserunlöslicher Farbstoff entsteht, sichtbar gemacht. Unspezifische Färbungen können verschiedene Ursachen haben. Bedeutsam sind unspezifische Antikörperbindungen an Gewebeproteine, die

zum Einen auf ionen- und elektrostatischen Wechselwirkungen und zum Anderen auf hydrophoben Interaktionen beruhen.

Abbildung 2-2



Die Abbildung zeigt links die regelrechte Bindungsfolge und rechts unspezifische Bindungen. (Geänderte Abbildung aus Handbuch I der Immunperoxidase Färbemethoden, Dako, Hamburg, D)

Endogene Peroxidaseaktivität kann im untersuchten Gewebe zu unspezifischen Färbungen führen. Sie findet sich vorrangig in roten und weißen Blutzellen. Zur Hemmung der endogenen Peroxidaseaktivität führen wir eine Behandlung mit Phenylhydrazin ($C_6H_8N_2$) oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2) durch.

Die Verdünnungen der Primärantikörper (Kap. 2.5.5) werden im Vorfeld ermittelt. Als Verdünnungslösung wird PBS/BSA/Azid verwendet. Dem PBS, pH 7,2 werden 1% bovines Serumalbumin (BSA) und 0,1% Natriumazid (NaN_3) zugesetzt. BSA soll Antikörperverluste verhindern, die durch Adsorption an Lagergefäßwände oder unspezifische Bindungen an den histologischen Schnitten auftreten können. Natriumazid (NaN_3) wirkt antibakteriell, so dass die Lösung über einen längeren Zeitraum bei 4°C gelagert werden kann. Nach der Primärantikörperinkubation setzten wir während der Verfahrensetablierung als Nachweisverfahren zum einen die Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode) sowie die EnVision™ Peroxidase-Methode ein (Kap. 2.5.6). Bei der ABC-Methode handelt es sich um ein zweistufiges Nachweisverfahren, bei dem das Glykoprotein Avidin vier Moleküle Biotin binden kann. Biotinylierte Peroxidase, Avidin und der Sekundärantikörper bilden einen Komplex (Abb. 2-3). Endogenes Biotin und Biotinbindungsstellen im Gewebe führen zu starken Hintergrundfärbungen. Um diese zu unterdrücken, wird der Primärantikörperlösung 0,00033% Avidin und dem biotinylierten Sekundärantikörper 0,002% Biotin zugesetzt. Um eine Kreuzreaktion der Sekundärantikörper mit Ratten-Immunglobulinen zu vermeiden, wird dem Sekundärantikörper 5% hitzeinaktiviertes Normalrattenserum (NRS) zugegeben.

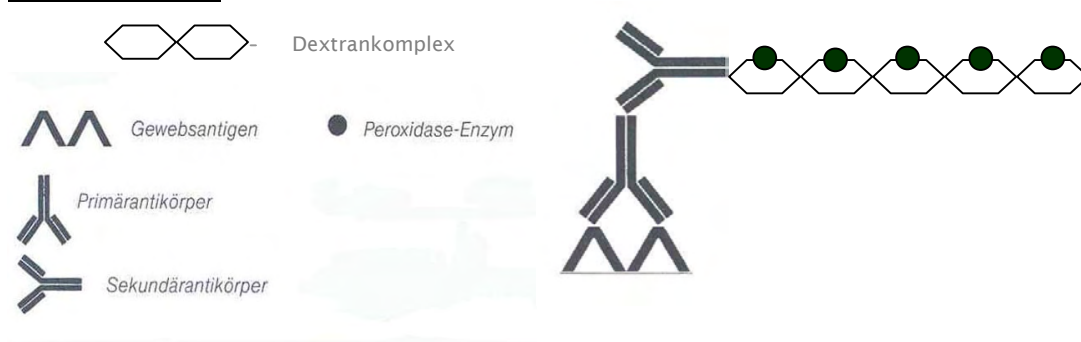
Abbildung 2-3



Prinzip der ABC-Methode. (Abbildung geändert aus Handbuch II der Immunperoxidase Färbemethoden, Dako, Hamburg, D)

Bei EnVision™ Peroxidase handelt es sich um Ziegen-anti-Maus-Immunglobuline (Ig), die mit Peroxidase markierten Dextrankomplexen konjugiert sind. Zur Vermeidung von Antikörperkreuzreaktionen werden dem Reagenz 5% hitzeinaktiviertes NRS zugesetzt. Aufgrund der großen Anzahl der an den Dextrankomplex konjugierten Peroxidasen besitzt das Verfahren eine hohe Sensitivität.

Abbildung 2-4



Prinzip der EnVision™ Peroxidase-Methode. (Abbildung geändert aus Handbuch II der Immunperoxidase Färbemethoden, Dako, Hamburg, D)

Die Farbentwicklung (Kap. 2.5.7) beruht auf folgendem Prinzip: Die Peroxidase bildet einen Enzym-Substrat-Komplex mit H_2O_2 und oxidiert das Chromogen, das sich dadurch in ein farbiges Reaktionsprodukt umwandelt. Das Chromogen, 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB), ruft eine braune Farbe hervor und ist in organischen Lösungsmitteln unlöslich.

2.5.1 Puffer

Phosphate-buffered saline (PBS, pH 7,2/0,15 M)

PBS als 10 x konzentrierte Stammlösung:

1. 80 g Natriumchlorid (NaCl)
 + 2 g Kaliumchlorid (KCl)
 + 14,24 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na₂HPO₄·2H₂O)
 + 2 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄)
2. mit Aqua reinst auf 1000 ml auffüllen

Vor der Verwendung des Puffers wird die Stammlösung 1:10 mit Aqua reinst verdünnt. Der pH-Wert liegt in der Regel bei pH 7,4. Dieser wird mit 1 n HCl auf pH 7,2 gebracht. PBS sollte wegen der begrenzten Haltbarkeit nur für maximal zwei Tage bei 4° C aufbewahrt werden.

Tris-buffered saline (TBS, pH 7,6/0,3 M)

- | | | | |
|---|--------|----------------------------------|---|
| | 6,05 g | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan | (C ₄ H ₁₁ NO ₃) |
| + | 9 g | Natriumchlorid | (NaCl) |
| + | 700 ml | Aqua reinst | |

Mit HCl 37% wird ein pH-Wert von 7,6 eingestellt und die Lösung mit Aqua reinst auf 1000 ml aufgefüllt.

Citratpuffer (pH 6,0/0,01 M)

- | | | | |
|---|--------|--------------------------|--|
| | 2,1 g | Citronensäure-Monohydrat | (C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O) |
| + | 900 ml | Aqua reinst | |

Mit 4 n Natronlauge (NaOH) wird ein pH-Wert von 6,0 eingestellt und die Lösung mit Aqua reinst auf 1000 ml aufgefüllt.

Sørensenpuffer (pH 7,3-7,4/0,1 M)

Wird als 2 x konzentrierte Stammlösung wie folgt angesetzt:

- | | | |
|---|----------|---|
| | 3,08 g | Natriumdihydrogenphosphat p.a. (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O) |
| + | 14,30 g | Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat p.a. (Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O) |
| + | 500 ml | Aqua reinst |

Der pH-Wert des Puffers stellt sich automatisch auf etwa pH 7,3 ein.

2.5.2 Entparaffinieren

Zum Entparaffinieren werden die Präparate wie folgt behandelt und abschließend zum Spülen in Aqua reinst gegeben.

Tabelle 2-7 Entparaffinieren

Zeit		Reagenz	Konzentration
10	min	Xylol	100%
10	min	Xylol	100%
10	min	Xylol	100%
3	min	Isopropanol	100%
3	min	Isopropanol	100%
3	min	Isopropanol	96%
3	min	Isopropanol	90%
3	min	Isopropanol	80%
3	min	Isopropanol	70%
3	min	Isopropanol	50%

2.5.3 Antigendemaskierung

Die spezifische Antigendemaskierung und Vorblockierung der endogenen Peroxidase differiert für die unterschiedlichen Primärantikörper. Zum Nachweis Ox33⁺ Zellen ist keine Antigendemaskierung notwendig. Die Antigendemaskierung ED1⁺ Zellen erfolgt mittels Autoklavieren, die der ED2⁺ und R73⁺ Zellen mittels Enzymverdau.

Autoklavieren

Die Objekte werden in einem Citratpuffer, pH 6,0 bei 120°C und 1,1 bar für 15 min autoklaviert, dann abgekühlt und in eine Küvette mit PBS, pH 7,2 überführt.

Enzymverdau

Die Protease Typ XIV wird in einem Verhältnis von 0,5 mg Protease/ml TBS, pH 7,6 angesetzt, je 20 µl auf die Objekte gegeben und in einer feuchten Kammer für 15 min inkubiert. Danach werden die Objekte 3 x mit PBS, pH 7,2 gespült (Pasteurpipette) und in eine Küvette mit PBS überführt. Im PBS werden die Objekte für 15 min gewaschen, wobei das PBS 1 x gewechselt wird.

2.5.4 Primärantikörper

Als Primärantikörper werden monoklonale Maus-anti-Ratte Antikörper ED1, ED2, R73 und Ox33 verwendet. Die optimalen Verdünnungen wurden in Versuchsreihen zu Beginn der Studie ermittelt. Sie sind zusammen mit der entsprechenden Spezifität des jeweiligen mAb in Tabelle 2-8 aufgeführt.

Tabelle 2-8 Antikörper

Antikörper	Spezifität	Isotyp	Verdünnung
ED1 ⁽¹⁾	lysosomales Membranprotein von Monozyten/Makrophagen ; CD68-artig	IgG1	1:500
ED2 ^(1,2)	Zellmembranprotein auf Monozyten/Makrophagen ; CD163	IgG2a	1:200
R73 ⁽³⁾	α/β -TZR konstante Region der β -Kette auf T-Lymphozyten	IgG1	1:500
Ox33 ⁽⁴⁾	<i>leukocyte common antigen</i> (B-Zell-Typ) reifer B-Lymphozyten (außer Plasmazellen); CD45RA	IgG1	1:500

[¹ 19, ² 114, ³ 46, ⁴ 110]

2.5.5 Inkubation mit verdünnter Primärantikörperlösung

Pro Objekt werden 20 μ l verdünnte Primärantikörperlösung zugegeben. Bei allen Ansätzen wird mindestens eine Negativkontrolle mitgeführt. Bei dieser werden 20 μ l der Verdünnungslösung PBS/BSA/Azid ohne Primärantikörper zugegeben. Die Inkubation erfolgt über 15-23 h bei 4°C in einer feuchten Kammer.

2.5.6 Nachweis der gebundenen Primärantikörper

Als Antikörperrnachweissystem verwenden wir bei allen Primärantikörpern EnVision™ Peroxidase. Bei diesem Verfahren erzielen wir eine intensivere und spezifischere Färbung der jeweiligen Zelltypen, als mit der in der Etablierungsphase verwendeten ABC-Methode.

ABC-Methode

Nach der Inkubation mit der Primärantikörperlösung folgt:

1. 3 x spülen mit PBS, pH 7,2 (Pasteurpipette)
2. Überführen der OT in eine Küvette mit PBS, pH 7,2, für 15 min (1 x wechseln)
3. Verdünnen des biotinylierten Sekundärantikörpers im Verhältnis 1:200 in PBS, pH 7,2, mit 5% NRS und 0,002% Biotin
4. Je 20 µl des Sekundärantikörpers auf die Schnitte geben
5. Inkubation des Sekundärantikörpers für 30 min bei RT in einer feuchten Kammer
6. 3 x spülen mit PBS, pH 7,2 (Pasteurpipette)
7. Überführen der OT in eine Küvette mit PBS, pH 7,2, für 15 min
8. Herstellung des Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes:
(30 min vor Verwendung ansetzen!)
 Lösung A im Verhältnis 1:50 mit PBS, pH 7,2, verdünnen
 Lösung B im Verhältnis 1:50 mit Lösung A mischen
9. Je 20 µl des Komplexes auf die Schnitte geben
10. Inkubation des „AB-Komplexes“ für 30 min bei RT in feuchter Kammer
11. 3 x spülen mit TBS, pH 7,6

EnVision™ Peroxidase-Methode

Nach der Inkubation mit der Primärantikörperlösung folgt:

1. 3 x spülen mit PBS, pH 7,2 (Pasteurpipette)
2. Peroxidase-konjugiertes EnVision™ anti-Maus + 5% NRS
3. Je 20 µl des Nachweisreagenz auf die Objekte geben
4. Inkubation des Nachweisreagenz für 30 min bei RT in feuchter Kammer
5. 3 x spülen mit TBS pH 7,6 (Pasteurpipette)

2.5.7 Farbreaktion

In 1 ml TBS, pH 7,6, werden 0,5 mg DAB gelöst. Zu dem DAB in TBS wird H₂O₂ gegeben.

Die Lösung wird wie folgt hergestellt:

1. H₂O₂-Verdünnung:
 20 µl Wasserstoffperoxid 30% (H₂O₂)
 + 500 µl Aqua reinst
2. 10 µl 1,2%ige H₂O₂-Lösung zu dem DAB in TBS geben
3. ca. 80 µl dieser Lösung auf Objekte geben und 10 min bei RT inkubieren
4. Abspülen der OT mit Aqua reinst
5. Überführen der OT in eine Küvette mit PBS, pH 7,2

Bemerkung zu Punkt 4:

Die DAB-Lösung wird in eine Küvette mit Natriumhypochloridlösung gespült, um das kanzerogene DAB zu oxidieren und zu entgiften.

2.5.8 Hämalaun- und Eosinfärbung

Zur besseren Beurteilung der Morphologie werden einige der immunhistochemisch gefärbten Präparate mit Hämalaun gegengefärbt (Tabelle 2-9). Zur morphologischen Beurteilung wird von jedem Präparat eine Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE-Färbung) angefertigt. Das Vorgehen ist in Tabelle 2-10 dargestellt.

Mayers Hämalaun

1. 1 g Hämatoxylin ($C_{16}H_{14}O_6 \cdot H_2O$)
 + 0,2 g Natriumjodat ($NaIO_3$)
 + 50 g Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat ($KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$)
 in 1 l Aqua reinst lösen
2. Die Lösung über Nacht stehen lassen
3. 50 g Chloralhydrat ($C_2H_3Cl_3O_2$)
 + 1 g Citronensäure-Monohydrat ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)
 zu der zuvor angesetzten Lösung geben und 30 min erhitzen

Eosinlösung

1. 1,0 g Eosin G ($C_{20}H_6Br_4Na_2O_5$) in 100 ml Aqua reinst lösen
2. Filtrieren; die Lösung kann bei RT gelagert werden, muss dann jedoch vor Gebrauch noch mal filtriert werden
3. Zur Gebrauchslösung einen Tropfen Eisessig pro 100 ml zugeben

Tabelle 2-9 Hämalaun-Gegenfärbung

Zeit		Reagenz
1	s	Aqua reinst
4	s	Hämalaun
1	min	Leitungswasser (H_2O)

Tabelle 2-10 HE-Färbung

Zeit		Reagenz	Konzentration
15	min	Xylol	100%
15	min	Xylol	100%
3	min	Isopropanol	100%
3	min	Isopropanol	100%
3	min	Isopropanol	96%
3	min	Isopropanol	90%
3	min	Isopropanol	80%

Fortsetzung Tabelle 2-10 HE-Färbung

Zeit		Reagenz	Konzentration
3	min	Isopropanol	70%
3	min	Isopropanol	50%
1	s	Aqua reinst	100%
8	min	<u>Mayers Hämalaun</u>	
1	s	Aqua reinst	100%
8	min	H ₂ O	
1	min	<u>Eosinlösung</u>	
1	s	Aqua reinst	100%

2.5.9 Entwässerung und Eindecken

Im Anschluss an die jeweilige Färbung werden die Objekte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Xylol überführt (Tab. 2-11). Anschließend werden sie mit Eukitt-Eindeckmedium eingedeckt. Die Aushärtung erfolgt unter dem Abzug.

Tabelle 2-11 Entwässerung

Zeit		Reagenz	Konzentration
1	s	Aqua reinst	100%
1	min	Isopropanol	70%
1	min	Isopropanol	90%
1	min	Isopropanol	100%
1	min	Isopropanol	100%
3	min	Xylol	100%
3	min	Xylol	100%

2.6 Auswertung

In der vorliegenden Arbeit wird die Infiltration von experimentellen Rattenlungentransplantaten mit M/M, T- und B-Lymphozyten verglichen. Der Beobachtungszeitraum erstreckt sich über die ersten sechs postoperativen Tage (d 1 – d 6).

Diese werden in drei Phasen eingeteilt. Phase I (d 1 – d 2), Phase II (d 3 – d 4), Phase III (d 5 – d 6). Die nicht transplantierten rechten Lungen werden als interne Kontrollen ausgewertet. Die isogen LEW→LEW (n=1/d) und allogene DA→LEW (n=3/d) transplantierten Tiere werden im Abstand von 24 h getötet.

Die verwendete histopathologische Klassifikation (Kap. 1.8) für die morphologische Auswertung der HE-gefärbten Paraffinschnitte beruht auf der *Revised working formulation for classification and grading of lung allograft rejection* [112]. Die von der ISHLT seit 2007 eingeführten Änderungen (Kap. 1.8) [93] sind nicht berücksichtigt, da die Auswertung der vorliegenden Arbeit bereits im Jahr 2005 abgeschlossen war und 2007 veröffentlicht wurde [82].

Bei der morphometrischen Auswertung wird die Transplantatinfiltration durch Leukozyten computergestützt beurteilt. Dazu wird semiquantitativ der prozentuale Anteil der immunpositiven Fläche in jeweils drei zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern densitometrisch gemessen. Bei einer 10 x mikroskopischen Objektvergrößerung entspricht die jeweils von der Digitalkamera erfasste Fläche 0,5835 mm². Die Messergebnisse bei einer pro Objekt erfassten Fläche von 1,7505 mm², sind als arithmetisches Mittel dargestellt.

Die Auswertung erfolgt mit einem Durchlichtmikroskop, an das eine Digitalkamera über einen Verlängerungstubus mit integriertem Zwischenokular angeschlossen ist. Die Erfassung und Analyse der Digitalbilder wird mit einer Bildanalyse-Software (analySIS®, Soft Imaging Solutions, Münster, D) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Histopathologische Veränderungen in Transplantaten

Grundlage der vorliegenden Studie ist ein experimentelles Modell der akuten Transplantatabstoßung. Die Auswertung erfolgt an HE-gefärbten Paraffinschnitten isogener/allogener Rattenlungentransplantate und umfasst die ersten 6 postoperativen Tage (d 1 – d 6). Diese werden in die Phasen I – III unterteilt und jeweils zwei Tage zu einer Phase zusammengefasst (Kap. 2.6). Grundlage ist die histologische Klassifikation von allogenen humanen Lungentransplantaten [112] der ISHLT (Kap. 1.8).

Isotransplantate

Bei der isogenen Kontrollgruppe bildet sich zu Beginn der Phase I ein intraalveoläres Ödem aus. Am Ende von Phase I (d 2) und in Phase II findet sich in den perivaskulären/-bronchialen Bereichen und im Alveolarraum ein minimales Leukozyteninfiltrat, das dem Stadium A1/B1, teilweise A1/B2 entspricht. Dieses ist in Phase III rückläufig und entspricht dem Stadium A0/B1, teilweise A1/B1. Die Becherzellichte entspricht dem Normalbefund. Die Organstruktur der Isotransplantate ist über den gesamten Beobachtungszeitraum intakt (Tab. 3-1, Abb. 3-1).

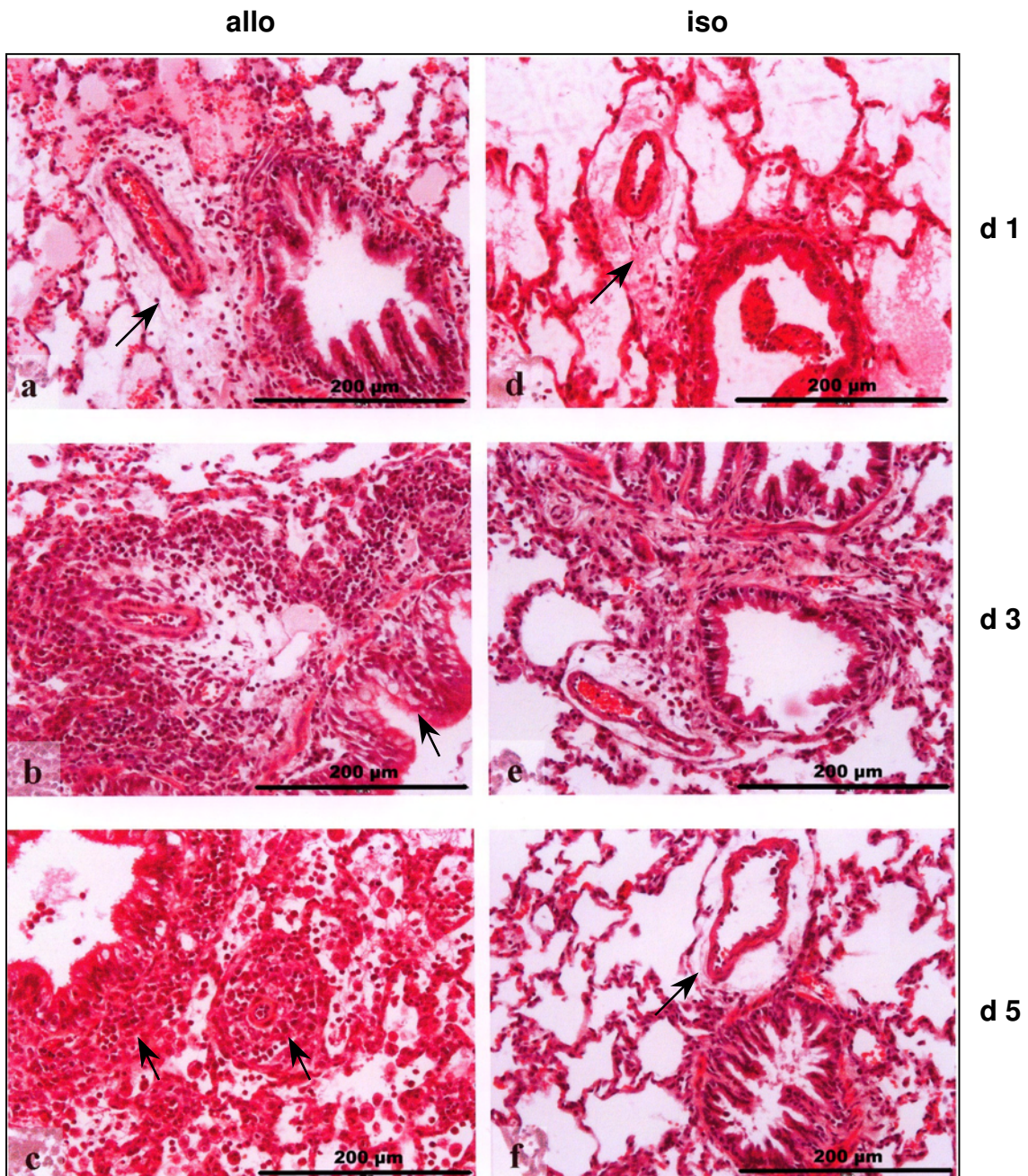
Allotransplantate

Bei der Abstoßungsgruppe bildet sich zu Beginn der Phase I ein intraalveoläres Ödem aus. Die perivaskuläre/-bronchiale Infiltration entspricht zu Beginn der Phase I (d 1) dem Stadium A1/B1, teilweise A1/B2. In Phase II dem Stadium A3/B3, teilweise A4/B3. In Phase III dem Stadium A4/B3, teilweise A4/B4. Ab Phase II kommt es zu einer fokalen Leukozyteninfiltration der Alveolarräume/-septen, die zu Beginn der Phase III ihr Maximum erreicht. Zellen mit granulozytärer Morphologie werden ab der späten Phase II (d 4) vereinzelt und in Phase III vermehrt in nekrotischen Bereichen nachgewiesen. Es findet sich in Phase II eine heftige Zunahme der Becherzellichte, die in Phase III wieder leicht rückläufig ist. Ab Phase II wird die Organstruktur partiell beeinträchtigt und in Phase III sind die Transplantate nahezu zerstört, sodass massive Leukozyteninfiltrate, Nekrosen und Einblutungen das Aussehen der Objekte bestimmen (Tab. 3-1, Abb. 3-1).

Tabelle 3-1 Histopathologische Veränderungen bei isogenen (iso) und allogenen (allo) Transplantaten

Kompartiment		Phase I (d 1 – d 2)	Phase II (d 3 – d 4)	Phase III (d 5 – d 6)
Blutgefäße	iso allo	Normalbefund Normalbefund	Normalbefund verdickte Gefäßwände/Thromben	Normalbefund
Perivaskuläre Bereiche	iso allo	Ödem ●● Leukozyten (●) Ödem ●● Leukozyten • (●●)	Ödem ● Leukozyten ● Leukozyten ●●● (●●●●)	Ödem ● Leukozyten (●) Leukozyten ●●●●
Bronchien/Bronchiolen	iso allo	Normalbefund Becherzelllichte ●	Normalbefund Becherzelllichte ●●●	Normalbefund Becherzelllichte ●●
Peribronchiale Bereiche	iso allo	Leukozyten (●) Leukozyten • (●●)	Leukozyten ● Leukozyten ●●	Leukozyten (●) Leukozyten ●●● (●●●●)
Alveolarsepten	iso allo	Normalbefund Leukozyten (●)	Normalbefund Leukozyten • (●●)	Normalbefund Leukozyten ●●
Alveolarraum	iso allo	Leukozyten (●) Leukozyten (●)	Leukozyten (●) Leukozyten ●● (●●●)	Leukozyten (●) Leukozyten ●●●●
Klassifikation [112]	iso allo	A1/B1 A1/B1 (A1/B2)	A1/B1 (A1/B2) A3/B3 (A4/B3)	A0/B1 (A1/B1) A4/B3 (A4/B4)

● minimale / ●● milde / ●●● moderate / ●●●● heftige / () fokale Anhäufung von Leukozyten

Abbildung 3-1

Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbte Paraffinschnitte von allogen (allo) DA→LEW (a-c) und isogen (iso) LEW→LEW (d-f) transplantierten Rattenlungen.

a Allotransplantat, **d** Isotransplantat am d 1 nach Transplantation: Die Organstruktur ist bei Iso- und Allotransplantaten intakt. Bei den Allotransplantaten findet sich eine Zunahme des diffus verteilten Leukozyteninfiltrats. Bei Iso- und Allotransplantaten bestehen perivaskuläre und intraalveoläre Ödeme (*Pfeile in Bild a und d zeigen perivaskuläre Ödeme*). **b** Allotransplantat, **e** Isotransplantat am d 3 nach Transplantation: Bei den Allotransplantaten finden sich perivaskulär dichte Leukozytenansammlungen sowie eine Zunahme der Becherzellichte in den Bronchien (*der Pfeil in Bild d zeigt respiratorisches Epithel mit Becherzellhyperplasie*). Bei den Isotransplantaten findet sich eine minimale diffuse Leukozyteninfiltration. **c** Allotransplantat, **f** Isotransplantat am d 5 nach Transplantation: Bei den Allotransplantaten finden sich dichte perivaskuläre/-bronchiale Leukozytenansammlungen mit Infiltration des Alveolarraums (*Pfeile in Bild c zeigen perivaskuläre/-bronchiale Leukozytenansammlungen*). Die Organstruktur der Allotransplantate ist stark beeinträchtigt. Bei den Isotransplantaten findet man kaum Infiltrate und eine intakte Organstruktur, jedoch bestehen ebenfalls perivaskuläre Ödeme (*Pfeil in Bild f zeigt ein perivaskuläres Ödem*).

3.2 Transplantatinfiltration durch Leukozyten

3.2.1 ED1⁺ Monozyten/Makrophagen

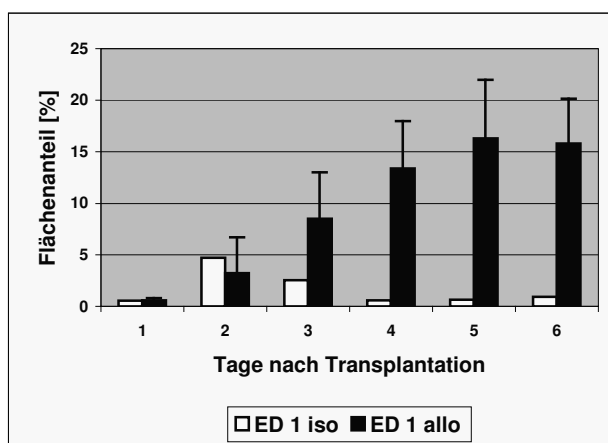
Isotransplantate

In den Phasen I – III befinden sich im Lungengewebe diffus verteilte ED1⁺ Zellen mit vermehrter Dichte in perivaskulären/-bronchialen Bereichen. Der Flächenanteil der ED1⁺ Zellen erreicht sein Maximum von 4,7% am d 2 und fällt im weiteren Beobachtungszeitraum auf unter 1% ab. (Tab. 3-2, Abb. 3-2, Abb. 3-3).

Allotransplantate

Bei den Allotransplantaten zeigt sich über den gesamten Beobachtungszeitraum eine stetige Vermehrung ED1⁺ Zellen. Dabei steigt der Flächenanteil von unter 1% am d 1, auf ein Plateau von über 13% ab d 4 an. Ab Phase II zeigen sich vermehrt ED1⁺ Zellen in den perivaskulären/-bronchialen Bereichen und den Alveolarsepten. Im Alveolarraum finden sich dichte Ansammlungen von AM. Die ED1⁺ Zellen im Alveolarraum sind vergrößert (12-20 µm) und stark angefärbt (Tab. 3-2, Abb. 3-2, Abb. 3-3).

Abbildung 3-2

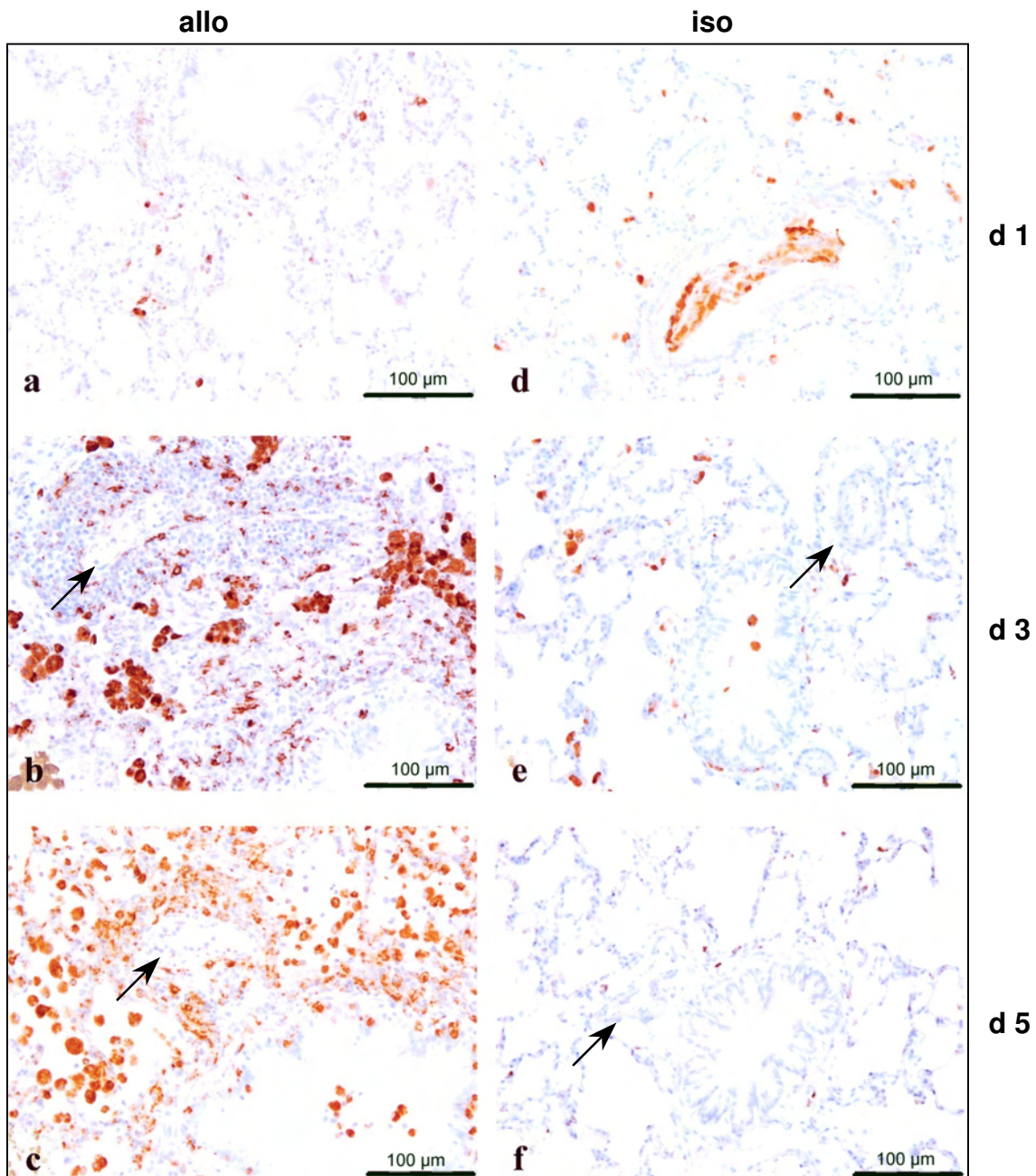


Flächenanteil ED1⁺ Monozyten/Makrophagen (%) im Lungengewebe, isogener und allogener Transplantate. Die weißen Säulen entsprechen den isogenen (iso) und die schwarzen Säulen den allogenen (allo) Transplantaten. Der Beobachtungszeitraum umfasst die ersten 6 postoperativen Tage (d 1 – d 6). Für die Allotransplantate (n=3/d) sind die Prozentwerte als arithmetisches Mittel +/- Standardabweichung dargestellt. Bei den Isotransplantaten wurde eine Transplantation pro Tag durchgeführt (n=1/d).

Tabelle 3-2 Infiltration ED1⁺ Monozyten/Makrophagen bei isogenen (iso) und allogenen (allo) Transplantaten

Kompartiment	Phase I (d 1 – d 2)		Phase II (d 3 – d 4)		Phase III (d 5 – d 6)	
Perivaskuläre/-bronchiale Bereiche	iso	•	•		(•)	
	allo	• (••)	••• (••••)		••••	
Alveolarsepten	iso	•	(•)		(•)	
	allo	•	•••		••••	
Alveolarraum	iso	•	(•)		(•)	
	allo	•	••• (••••)		••••	
Durchmesser ED1 ⁺ Zellen	iso	(10-12 µm)	(10-12 µm)		(10-12 µm)	
	allo	(10-12 µm)	(12-20 µm)		(12-20 µm)	
Flächenanteil ED1 ⁺ Zellen	iso	d 1 0,6%	d 3 2,5%		d 5 0,6%	
		d 2 4,7%	d 4 0,6%		d 6 0,9%	
	allo	d 1 0,6%	d 3 8,5%		d 5 16,3%	
		d 2 3,2%	d 4 13,4%		d 6 15,8%	

• minimale / •• milde / ••• moderate / •••• heftige / () fokale Anhäufung ED1⁺ Zellen

Abbildung 3-3

ED1⁺ Monozyten/Makrophagen in Paraffinschnitten von allogenen (allo) DA→LEW (a-c) und isogen (iso) LEW→LEW (d-f) transplantierten Rattenlungen. Immunpositive Strukturen sind braungefärbt; leichte Gegenfärbung mit Hämalaun.

a Allotransplantat, **d** Isotransplantat am d 1 nach Transplantation: Zum Beginn von Phase I finden sich bei Iso- und Allotransplantaten vereinzelte ED1⁺ Zellen in perivaskulären/-bronchialen Bereichen sowie diffus verteilte ED1⁺ Zellen im Lungengewebe. **b** Allotransplantat, **e** Isotransplantat am d 3 nach Transplantation: Bei den Isotransplantaten ist die Dichte der ED1⁺ Zellen bereits rückläufig. Bei den Allotransplantaten finden sich dichte perivaskuläre/-bronchiale Infiltrate ED1⁺ Zellen sowie eine zunehmende Leukozyteninfiltration der Alveolarräume/-septen. **c** Allotransplantat, **f** Isotransplantat am d 5 nach Transplantation: Bei den Isotransplantaten ist die Dichte ED1⁺ Zellen weiter rückläufig. Bei den Allotransplantaten gibt es im perivaskulären/-bronchialen Raum nur eine schwache Anfärbung ED1⁺ Zellen, wohingegen die Alveolarräume/-septen mit stark gefärbten ED1⁺ Zellen infiltriert sind (der Pfeil in Bild b und c zeigt jeweils ein Gefäß mit sowie im Bild e und f ohne ED1⁺ perivaskuläres Infiltrat).

3.2.2 ED2⁺ Makrophagen

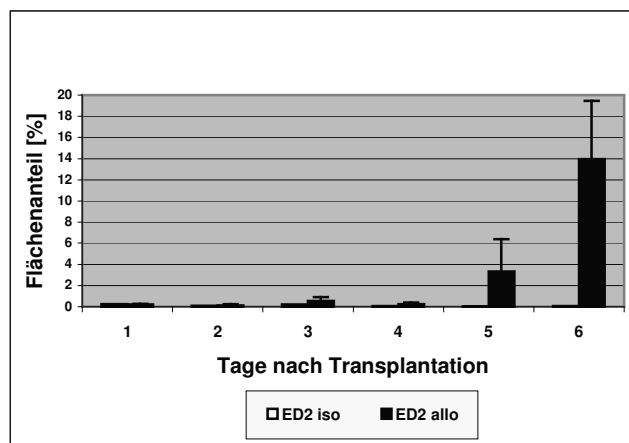
Isotransplantate

In den Phasen I – III zeigen sich diffus verteilte ED2⁺ Zellen in den perivaskulären/-bronchialen Bereichen sowie einzelne ED2⁺ Zellen in den Alveolarsepten. Im Lungengewebe steigt der Flächenanteil ED2⁺ Zellen nicht über 1% an (Tab. 3-3, Abb. 3-4, Abb. 3-5).

Allotransplantate

Die perivaskuläre/-bronchiale Infiltration nimmt in den Phasen I – III stetig zu. Dabei sind die Ansammlungen ED2⁺ Zellen bis d 4 hauptsächlich auf den perivaskulären Raum beschränkt. Die peribronchialen Ansammlungen fallen geringer aus, bilden jedoch dichte Anhäufungen immunpositiver Zellen. In den Alveolarräumen/-septen steigt die Dichte ED2⁺ Zellen ab d 5 an. Dadurch nimmt der Flächenanteil ED2⁺ Zellen ab d 5 deutlich zu und erreicht am d 6 das Maximum von 14%. Morphologisch lässt sich ein Großteil der ED2⁺ Zellen im Alveolarraum als AM identifizieren (Tab. 3-3, Abb. 3-4, Abb. 3-5).

Abbildung 3-4

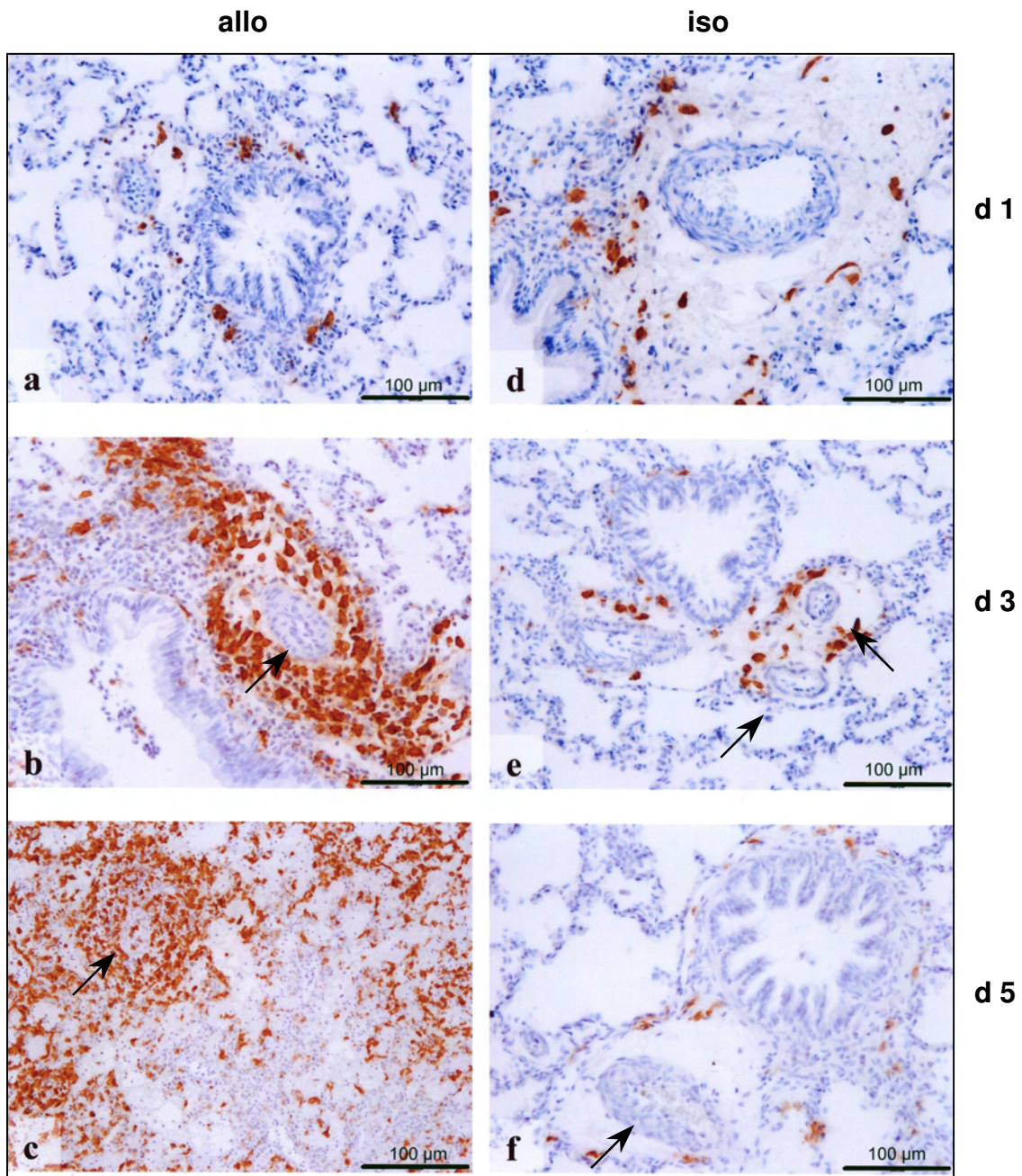


Flächenanteil ED2⁺ Makrophagen (%) im Lungengewebe, isogener (iso) und allogener (allo) Transplantate. Die weißen Säulen (aufgrund des geringen Flächenanteils ED2⁺ Makrophagen kaum sichtbar) entsprechen den isogenen und die schwarzen Säulen den allogenen Transplantaten. Der Beobachtungszeitraum umfasst die ersten 6 postoperativen Tage (d 1 – d 6). Für die Allotransplantate (n=3/d) sind die Prozentwerte als arithmetisches Mittel \pm Standardabweichung dargestellt. Bei den Isotransplantaten wurde eine Transplantation pro Tag durchgeführt (n=1/d).

Tabelle 3-3 Infiltration ED2⁺ Makrophagen bei isogenen (iso) und allogenen (allo) Transplantaten

Kompartiment	Phase I (d 1 – d 2)		Phase II (d 3 – d 4)		Phase III (d 5 – d 6)
Perivaskuläre Bereiche	iso	(•)	(•)	(•)	(•)
	allo	(•)	••• (•••••)	••• (•••••)	••• (•••••)
Peribronchiale Bereiche	iso	(•)	(•)	(•)	(•)
	allo	(•)	• (••)	• (••)	• (••)
Alveolarsepten	iso	(•)	(•)	(•)	(•)
	allo	(•)	• (••)	•• (•••)	•• (•••)
Alveolarraum	iso	Normalbefund	Normalbefund	Normalbefund	Normalbefund
	allo	Normalbefund	(•)	••• (•••••)	••• (•••••)
Flächenanteil ED2 ⁺ Zellen	iso	d 1 < 0,3%	d 3 < 1,0%	d 5 < 1,0%	d 5 < 1,0%
		d 2 < 0,3%	d 4 < 1,0%	d 6 < 1,0%	d 6 < 1,0%
	allo	d 1 < 0,3%	d 3 < 1,0%	d 5 3,3%	d 5 3,3%
		d 2 < 0,3%	d 4 < 1,0%	d 6 14,0%	d 6 14,0%

• minimale / •• milde / ••• moderate / •••• heftige / () fokale Anhäufung ED2⁺ Zellen

Abbildung 3-5

ED2⁺ Makrophagen in Paraffinschnitten von allogenen (allo) DA→LEW (a-c) und isogenen (iso) LEW→LEW (d-f) transplantierten Rattenlungen. Immunpositive Strukturen sind braungefärbt; leichte Gegenfärbung mit Hämalaun.

a Allotransplantat, **d** Isotransplantat am d 1 nach Transplantation: In dieser Phase finden sich zwischen Iso- und Allotransplantaten keine Unterschiede. Es besteht eine diskrete perivaskuläre/-bronchiäre Infiltration. **b** Allotransplantat, **e** Isotransplantat am d 3 nach Transplantation: Während sich bei der Infiltration der Isotransplantate keine Änderungen ergeben, kommt es bei den Allotransplantaten ab d 3 zu einer Zunahme des ED2⁺ perivaskulären Infiltrats. **c** Allotransplantat, **f** Isotransplantat am d 5 nach Transplantation: Bei den Isotransplantaten ist der Anteil der ED2⁺ Zellen unverändert. Bei den Allotransplantaten zeigt sich ab d 5 neben den dichten perivaskulären Infiltratmanschetten eine flächige Ausweitung des Infiltrats in den Alveolarraum (die Pfeile in Bild b und c zeigen jeweils ein Gefäß mit sowie in Bild e und f ohne ED2⁺ perivaskuläres Infiltrat).

3.2.3 R73⁺ T-Lymphozyten

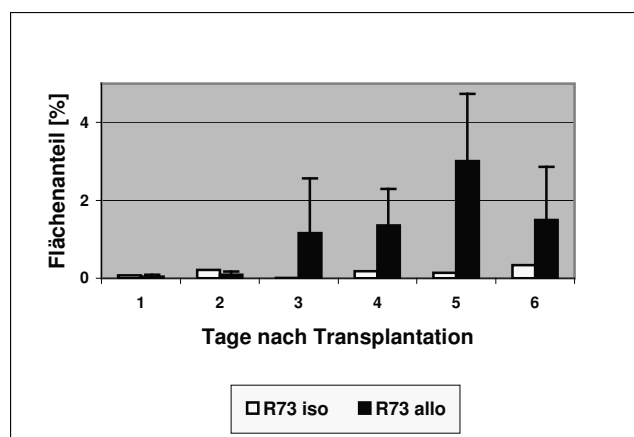
Isotransplantate

Bei den Isotransplantaten befinden sich die R73⁺ Zellen während des gesamten Beobachtungszeitraum vereinzelt und diffus verteilt in den perivaskulären/-bronchialen Bereichen sowie in den Alveolarsepten. Der immunpositive Flächenanteil liegt während des gesamten Beobachtungszeitraums < 1% (Tab. 3-4, Abb. 3-6, Abb. 3-7).

Allotransplantate

Bei den Allotransplantaten befinden sich die R73⁺ Zellen in Phase I vereinzelt und diffus verteilt in den perivaskulären/-bronchialen Bereichen sowie den Alveolarräumen/-septen. Dies entspricht weitgehend dem Bild der Isotransplantate. In der Phase II kommt es zur Dichtezunahme R73⁺ Zellen in den perivaskulären Bereichen. Am Ende der Phase II zeigt sich eine Ausweitung des R73⁺ Infiltrats in die Alveolarsepten. Im Alveolarraum finden sich nur vereinzelte, diffus verteilte R73⁺ Zellen. Am d 5 wird mit einem Flächenanteil von 3% das Maximum im Beobachtungszeitraum erreicht. In stark verdichteten oder durch Nekrosen beeinträchtigten Bereichen kommt es am Ende von Phase III zu einer Abnahme der Dichte R73⁺ Zellen (Tab. 3-4, Abb. 3-6, Abb. 3-7).

Abbildung 3-6

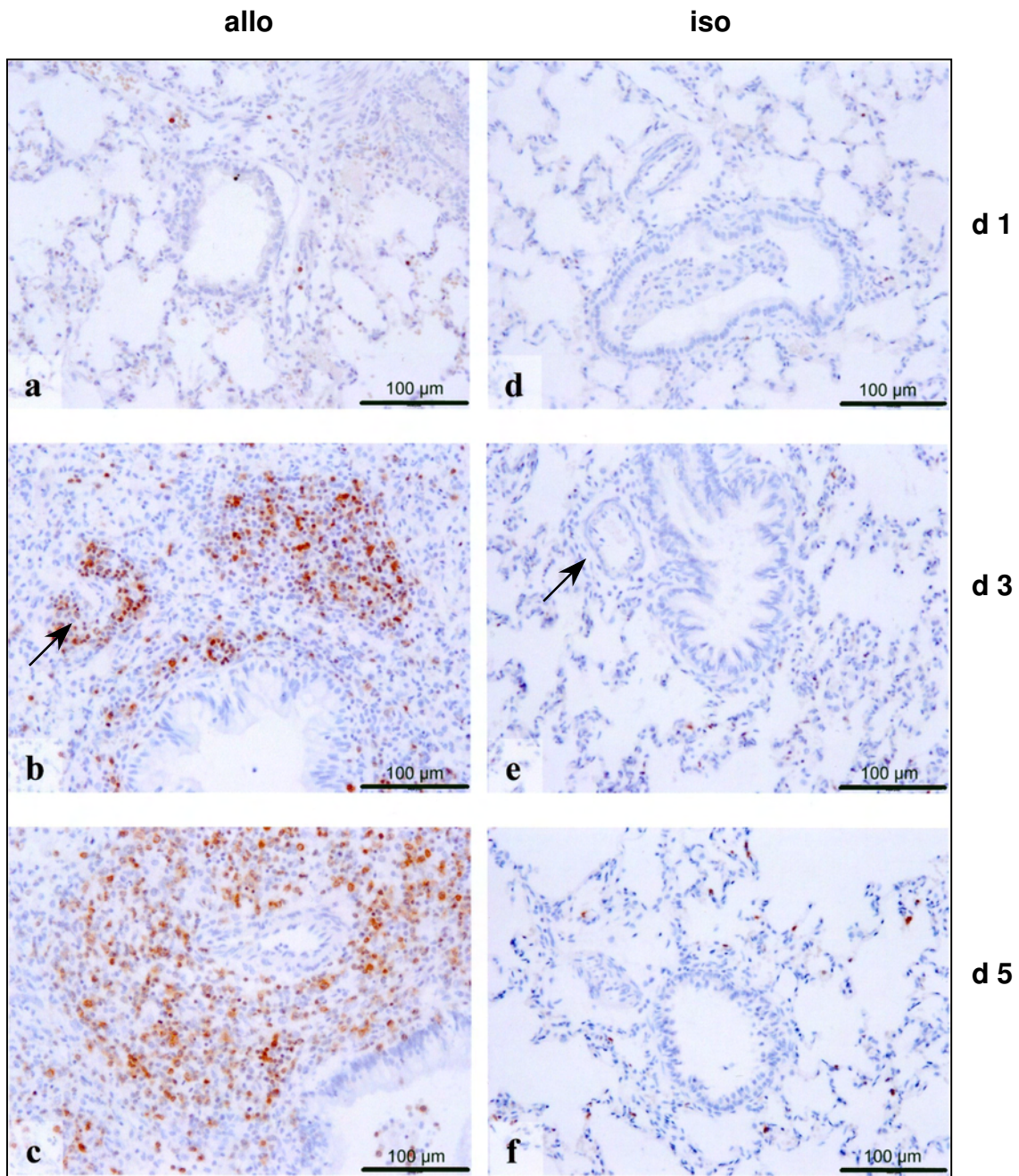


Flächenanteil R73⁺ T-Lymphozyten (%) im Lungengewebe, isogener (iso) und allogener (allo) Transplantate. Die weißen Säulen entsprechen den isogenen und die schwarzen Säulen den allogenen Transplantaten. Der Beobachtungszeitraum umfasst die ersten 6 postoperativen Tage (d 1 – d 6). Für die Allotransplantate (n=3/d) sind die Prozentwerte als arithmetisches Mittel +/- Standardabweichung dargestellt. Bei den Isotransplantaten wurde eine Transplantation pro Tag durchgeführt (n=1/d).

Tabelle 3-4 Infiltration R73⁺ T-Lymphozyten bei isogenen (iso) und allogenen (allo) Transplantaten

Kompartiment	Phase I (d 1 – d 2)		Phase II (d 3 – d 4)		Phase III (d 5 – d 6)
Perivaskuläre Bereiche	iso	(●)	(●)	(●)	(●)
	allo	(●)	●●●	●● (●●●)	●● (●●●)
Peribronchiale Bereiche	iso	Normalbefund	(●)	(●)	(●)
	allo	(●)	●●	●●	●●
Alveolarsepten	iso	(●)	(●)	(●)	(●)
	allo	(●)	● (●●)	●●	●●
Alveolarraum	iso	Normalbefund	(●)	(●)	(●)
	allo	Normalbefund	● (●●)	●●	●●
Flächenanteil R73 ⁺ Zellen	iso	d 1 < 0,3%	d 3 < 0,2%	d 5 < 1,0%	
		d 2 < 0,3%	d 4 < 0,2%	d 6 < 1,0%	
	allo	d 1 < 0,3%	d 3 1,2%	d 5 3,0%	
		d 2 < 0,3%	d 4 1,4%	d 6 1,5%	

• minimale / •• milde / ••• moderate / •••• heftige / () fokale Anhäufung R73⁺ Zellen

Abbildung 3-7

R73⁺ T-Lymphozyten in Paraffinschnitten von allogenen (allo) DA→LEW (a-c) und isogen (iso) LEW→LEW (d-f) transplantierten Rattenlungen. Immunpositive Strukturen sind braungefärbt; leichte Gegenfärbung mit Hämalaun.

a Allotransplantat, **d** Isotransplantat am d 1 nach Transplantation: Zu Beginn von Phase I finden sich bei Iso- und Allotransplantaten vereinzelt diffus verteilte R73⁺ Zellen. **b** Allotransplantat, **e** Isotransplantat am d 3 nach Transplantation: Bei den Isotransplantaten kommt es kaum zu Veränderungen, während bei den Allotransplantaten die Dichte der R73⁺ Zellen in den perivaskulären Bereichen zunimmt (der Pfeil in Bild b zeigen jeweils ein Gefäß mit sowie in Bild e ohne R73⁺ perivaskuläres Infiltrat). Fokal zeigt sich eine Zunahme des Infiltrats in den Alveolarräumen/-septen. **c** Allotransplantat, **f** Isotransplantat am d 5 nach Transplantation: In verdichteten oder durch Nekrosen beeinträchtigten Bereichen findet sich ab d 5 eine Abnahme der immunpositiven Zelldichte.

3.2.4 Ox33⁺ B-Lymphozyten

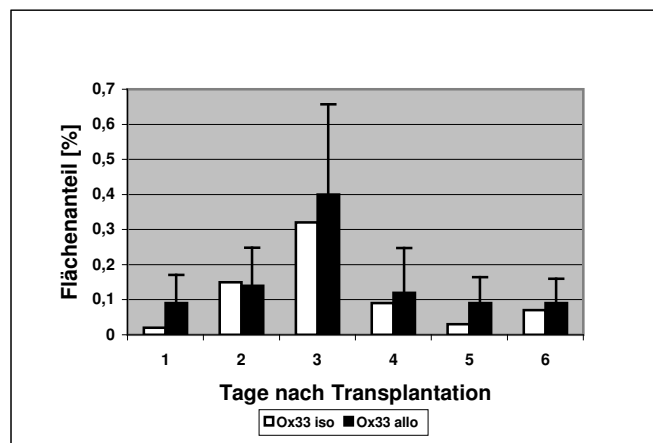
Isotransplantate

Bei den Isotransplantaten finden sich in den Phasen I – III vereinzelte, diffus verteilte Ox33⁺ Zellen. In der Phase II kommt es zu einer minimalen Zunahme des immunpositiven Infiltrats. Das Dichtemaximum im Lungengewebe wird am d 3 mit 0,3% erreicht und fällt in Phase III auf < 0,1%. In der Phase III entspricht die Dichte der Ox33⁺ Zellen den Verhältnissen der Phase I (Tab. 3-5, Abb. 3-8, Abb. 3-9).

Allotransplantate

Bei den Allotransplantaten finden sich in Phase I vereinzelte, diffus verteilte Ox33⁺ Zellen in perivaskulären/-bronchialen Bereichen sowie in den Alveolarräumen/-septen. In den perivaskulären/-bronchialen Bereichen kommt es in Phase II zu einer minimalen Dichtezunahme der Ox33⁺ Zellen. Das Dichtemaximum in den Alveolarräumen/-septen wird am d 3 mit 0,4% erreicht und fällt in Phase III auf < 0,2%. In stark verdichteten oder durch Nekrosen beeinträchtigten Bereichen lassen sich kaum noch immunpositive Zellen nachweisen. In der Phase III entspricht die Dichte der Ox33⁺ Zellen den Verhältnissen der Phase I (Tab. 3-5, Abb. 3-8, Abb. 3-9).

Abbildung 3-8

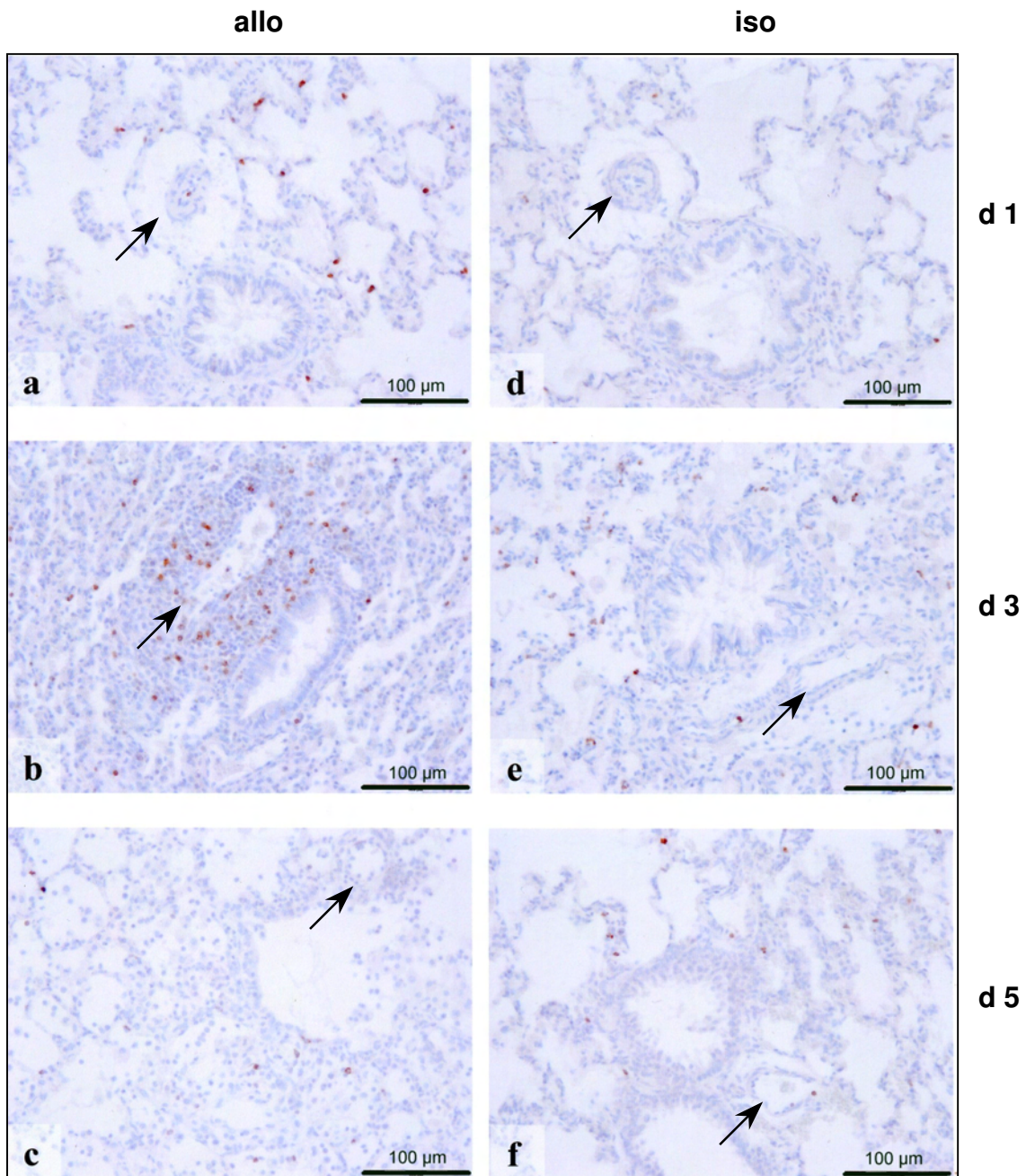


Flächenanteil Ox33⁺ B-Lymphozyten (%) im Lungengewebe, isogener (iso) und allogener (allo) Transplantate. Die weißen Säulen entsprechen den isogenen und die schwarzen Säulen den allogenen Transplantaten. Der Beobachtungszeitraum umfasst die ersten 6 postoperativen Tage (d 1 – d 6). Für die Allotransplantate (n=3/d) sind die Prozentwerte als arithmetisches Mittel +/- Standardabweichung dargestellt. Bei den Isotransplantaten wurde eine Transplantation pro Tag durchgeführt (n=1/d).

Tabelle 3-5 Infiltration Ox33⁺ B-Lymphozyten bei isogenen (iso) und allogenen (allo)Transplantaten

Kompartiment	Phase I (d 1 – d 2)		Phase II (d 3 – d 4)		Phase III (d 5 – d 6)	
Perivaskuläre Bereiche	iso	(•)	(•)	(•)	(•)	(•)
	allo	(•)	•	•	(•)	(•)
Peribronchiale Bereiche	iso	(•)	(•)	(•)	(•)	(•)
	allo	(•)	•	•	(•)	(•)
Alveolarsepten	iso	(•)	(•)	(•)	(•)	(•)
	allo	(•)	•	•	(•)	(•)
Alveolarraum	iso	Normalbefund	Normalbefund	Normalbefund	Normalbefund	Normalbefund
	allo	Normalbefund	Normalbefund	Normalbefund	Normalbefund	Normalbefund
Flächenanteil Ox33 ⁺ -Zellen	iso	d 1 < 0,2%	d 3 0,3%	d 5 < 0,1%	d 6 < 0,1%	d 5 < 0,1%
		d 2 < 0,2%	d 4 < 0,3%	d 5 < 0,2%	d 6 < 0,2%	d 5 < 0,2%
	allo	d 1 < 0,2%	d 3 0,4%	d 5 < 0,2%	d 6 < 0,2%	d 5 < 0,2%
		d 2 < 0,2%	d 4 < 0,3%	d 5 < 0,2%	d 6 < 0,2%	d 5 < 0,2%

• minimale / •• milde / ••• moderate / •••• heftige / () fokale Anhäufung Ox33⁺ Zellen

Abbildung 3-9

Ox33⁺ B-Lymphozyten in Paraffinschnitten von allogenen (allo) DA→LEW (a-c) und isogen (iso) LEW→LEW (d-f) transplantierten Rattenlungen. Immunpositive Strukturen sind braun gefärbt; leichte Gegenfärbung mit Hämalaun.

a Allotransplantat, **d** Isotransplantat am d 1 nach Transplantation: Bei Iso- und Allotransplantaten finden sich im Lungengewebe vereinzelt diffus verteilte Ox33⁺ Zellen. **b** Allotransplantat, **e** Isotransplantat am d 3 nach Transplantation: Bei den Allotransplantaten kommt es in den perivaskulären Bereichen zur geringen Dichtezunahme Ox33⁺ Zellen. Bei Iso- und Allotransplantaten kommt es zur Dichtezunahme Ox33⁺ Zellen in den Alveolarräumen/-septen. **c** Allotransplantat, **f** Isotransplantat am d 5 nach Transplantation: Bei Iso- und Allotransplantaten kommt es zur Dichteabnahme Ox33⁺ Zellen, diese sind vereinzelt und diffus verteilt nachweisbar (die Pfeile zeigen Gefäße).

3.3 Vergleich von Iso- und Allotransplantaten

In den Abbildungen 3-10 und 3-11 sind die Verläufe des immunpositiven Flächenanteils für die verschiedenen Zelltypen gegenübergestellt.

Bei den Isotransplantaten dominiert am d 2 mit 4,7% der Flächenanteil ED1⁺ M/M, der im Verlauf bis auf < 1% abfällt. Der Flächenanteil der ED2⁺, R73⁺ und Ox33⁺ Zellen liegt während des gesamten Beobachtungszeitraums < 1% (Abb. 3-10).

Bei den Allotransplantaten wird der stetige Anstieg und die Dominanz des Flächenanteils ED1⁺ M/M deutlich. Dabei steigt der Flächenanteil von < 1% am d 1, auf > 13% ab d 4 an. In der Phase III kommt es zur Erhöhung des Flächenanteils ED2⁺ Makrophagen, das Maximum wird an d 6 erreicht. Der Flächenanteil der R73⁺ Zellen steigt in Phase II stetig an, das Maximum von 3% wird am d 5 erreicht. Am d 6 sinkt der Flächenanteil R73⁺ Zellen wieder ab. Der Flächenanteil Ox33⁺ Zellen liegt während des gesamten Zeitraums unter 0,5% (Abb. 3-11).

Zusammenfassend wird in den Abbildungen 3-10 und 3-11 die quantitative Dominanz der M/M bei der Transplantatabstoßung deutlich.

Abbildung 3-10

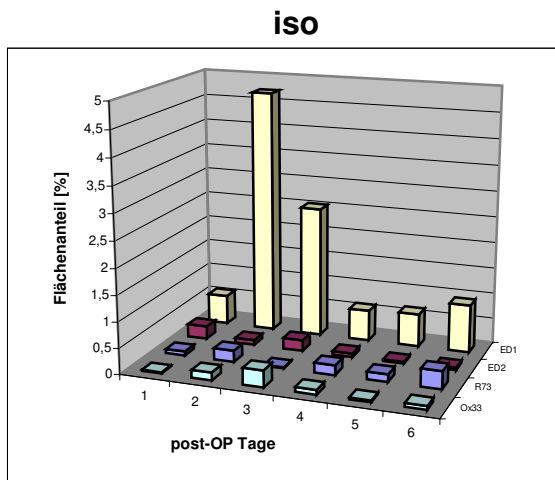
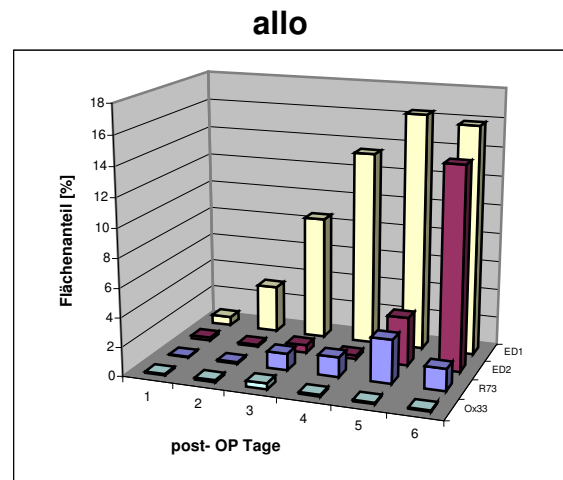


Abbildung 3-11



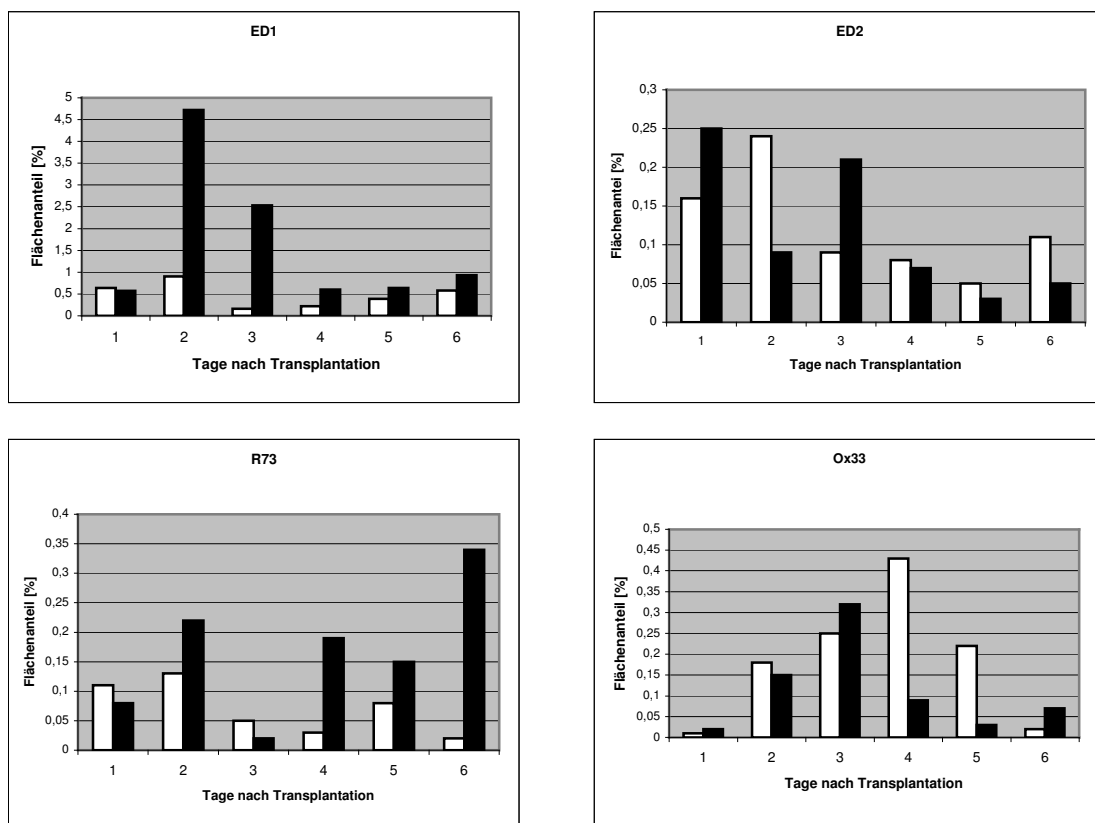
Zusammenfassende Darstellung der immunpositiven Flächenanteile (%) isogener (iso) und allogener (allo) Transplantate. Der Beobachtungszeitraum umfasst die ersten 6 postoperativen Tage (d 1 – d 6).

3.4 Veränderungen der nativen rechten Empfängerlungen

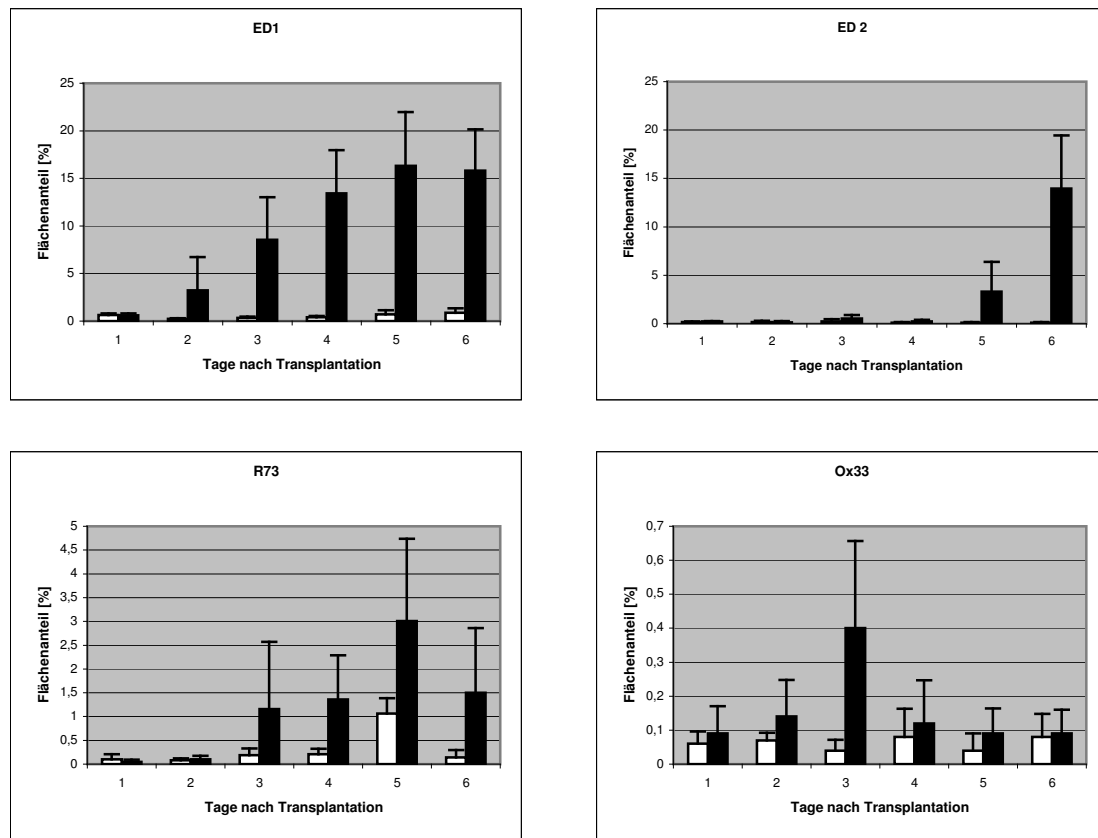
Die Organstruktur der rechten nicht transplantierten Empfängerlungen entspricht während des gesamten Beobachtungszeitraums weitgehend dem Normalbefund. Die Leukozyteninfiltration entspricht durchgängig dem Stadium A1/B1. Das perivaskuläre/-bronchiale Ödem ist im Vergleich zu den transplantierten Lungen wesentlich geringer ausgeprägt oder fehlt ganz. Die zelltypabhängige Leukozyteninfiltration der rechten Lungen findet in weitaus geringerem Maße statt.

Ein den linken allogenen transplantierten Lungen entsprechender Infiltrationsverlauf findet sich bei den R73⁺ Zellen (Kap. 4.2.3). Die immunpositive Zelldichte steigt ebenfalls ab d 3 an und erreicht am d 5 das Maximum. Dabei wird jedoch nur etwa ein Drittel der immunpositiven Zelldichte erreicht (Abb. 3-12, Abb. 3-13).

Abbildung 3-12



Gegenüberstellung immunpositiver Flächenanteile (%) der rechten nicht transplantierten Empfängerlungen und der isogenen Transplantate. Die weißen Säulen entsprechen den rechten Empfängerlungen und die schwarzen Säulen den linken isogen transplantierten Lungen. Der Beobachtungszeitraum umfasst die ersten 6 postoperativen Tage (d 1 – d 6). Bei den Isotransplantaten wurde eine Transplantation pro Tag durchgeführt (n=1/d).

Abbildung 3-13

Gegenüberstellung immunpositiver Flächenanteile (%) der rechten nicht transplantierten Empfängerlungen und der allogenen Transplantate. Die weißen Säulen entsprechen den rechten Empfängerlungen und die schwarzen Säulen den linken allogenen transplantierten Lungen. Der Beobachtungszeitraum umfasst die ersten 6 postoperativen Tage (d 1 – d 6). Für die Allotransplantate (n=3/d) sind die Prozentwerte als arithmetisches Mittel \pm Standardabweichung dargestellt.

4 Diskussion

4.1 Diskussion von Material und Methoden

4.1.1 Konservierung und Transplantation der Lungen

Wichtige Ziele bei der klinischen Lungentransplantation zur Vermeidung von Ischämie-/Reperfusionsschäden, sind ein optimaler Grad der Gefäßdilatation sowie der Erhalt der bestmöglichen endothelialen Zellintegrität. Angestrebt wird eine möglichst homogene Verteilung der Konservierungslösung, eine rasche Ausspülung toxischer Metabolite und Blutbestandteile sowie eine gleichmäßige und schnelle Kühlung. Hierfür werden spezielle Konservierungslösungen verwendet (Kap. 1.4.1).

Die eingangs genannten Anforderungen, wie bei der klinischen Lungentransplantation angestrebt, werden in unserem Modell nicht umgesetzt. Bei unseren Untersuchungen werden bei der Explantation der Lunge die Aorta abdominalis und Vena cava inferior eröffnet. Über den rechten Ventrikel und den Truncus pulmonalis erfolgt die Instillation von 20 ml kalter isotoner Kochsalzlösung. Dabei wird blasenfrei und mit einem Druck von 20 cm Wassersäule über etwa 2 min perfundiert. Danach werden die Organe sofort mit *cuffs* versehen und nur für eine kurze Zeit während der Vorbereitung des Empfängers kalt gelagert. Die warme Ischämiezeit beträgt maximal 22 min, die kalte Ischämiezeit ungefähr 20 min (Kap. 2.3).

Auf die Verwendung einer Konservierungslösung wird bei diesen Ischämiezeiten verzichtet. Eine gewisse verfahrensbedingte Beeinflussung der Ergebnisse durch Ischämie-/Reperfusionsschäden ist also möglich (Kap. 1.4.1). Die im Beobachtungszeitraum auftretenden Organveränderungen der isogenen Kontrollgruppe werden mit denen der Abstoßungsgruppe verglichen. Die Transplantationen in beiden Gruppen erfolgen unter den gleichen Bedingungen. Damit handelt sich bei der verfahrensbedingten Beeinflussung formal um einen systematischen Fehler, der bei der Auswertung berücksichtigt wird.

Die jeweiligen minimalen Veränderungen der Phase I im Vergleich zu Normallungen sind am ehesten als verfahrensbedingt anzusehen und werden damit als ischämie-/reperusionsbedingt gewertet. In den Phasen II und III sind die weiteren Veränderungen der isogenen Kontrollgruppe marginal, während es bei der Abstoßungsgruppe zu fulminanten Veränderungen kommt. Die ebenfalls

ausgewerteten nicht transplantierten rechten Lungen entsprechen weitgehend dem Bild von Normallungen (Kap. 3.4).

Der verfahrensbedingte Einfluss im Sinne von Ischämie-/Reperfusionsschäden scheint in unseren Untersuchungen, welche die ersten 6 postoperativen Tage berücksichtigen, von untergeordneter Bedeutung zu sein. Zukünftige Untersuchungen sollten diesen Aspekt jedoch berücksichtigen, um Störfaktoren zu minimieren und standardisierte Bedingungen für die experimentellen Untersuchungen zu schaffen. In diesem Zusammenhang erscheint auch die, über den d 6 hinausgehende Prognose der isogenen Kontrollgruppe interessant (Kap. 4.2.1).

Die initialen Mechanismen der Ischämie-/Reperfusionsschäden (Kap. 1.4.1) werden als Prädispositionen für die akute und chronische Transplantatabstoßung diskutiert [28].

4.1.2 Gewebepathologie und Auswertung

Die Tiere werden per inhalationem getötet und die Lungen entnommen. Anschließend werden diese transversal im Abstand von 2-3 mm zerteilt und in ein Fixans gegeben. Qualitätskriterien im Rahmen der Verfahrensetablierung sind eine möglichst intensive Anfärbung der nachzuweisenden Zellen bei minimierter Hintergrundanfärbung. Neben dem geeigneten Fixans (Kap. 2.4.1), sind die optimale Verdünnung der Primärantikörper (Kap. 2.5.4 und 2.5.5), die Antigendemaskierung (Kap. 2.5.3) sowie das Nachweisverfahren mittels Sekundärantikörper (Kap. 2.5.6) wichtige Parameter.

Als Fixans werden eine gepufferte Paraformaldehyd-Lösung sowie eine PLP-Lösung verglichen. Aufgrund besserer Ergebnisse, im Hinblick auf die Anfärbung der nachzuweisenden Zellen, werden die Untersuchungen mittels PLP-Lösung durchgeführt.

Das Verfahren der spezifische Antigendemaskierung differiert für die unterschiedlichen Primärantikörper. Zum Nachweis Ox33⁺ Zellen ist keine Antigendemaskierung notwendig. Die Antigendemaskierung zur Färbung ED1⁺ Zellen erfolgt mittels Autoklavierung, die der ED2⁺ und R73⁺ Zellen mittels Enzymverdau.

Als Antikörperrnachweissystem verwenden wir bei allen Zelltypen EnVision™ Peroxidase. Bei diesem Verfahren erzielen wir eine intensivere und

spezifischere Färbung der jeweiligen Zelltypen, als mit der ebenfalls in der Etablierungsphase verwendeten ABC-Methode.

Bei der Auswertung (Kap. 1.8 und 2.6) ist der direkte Vergleich der Zellinfiltration pro Flächenanteil für die einzelnen Zelltypen erschwert. Ursächlich hierfür sind unterschiedliche Zellgrößen sowie Färbereigenschaften der Zellen. Weiterhin erschweren abstoßungsbedingte Veränderungen der Transplantatmorphologie die Bestimmung des Flächenanteils. So ist bei M/M die Eigenschaft zur intensiven Anfärbung sowie die Zellgröße abhängig vom Aktivierungsgrad der Zellen [37, 84].

Ein weiterer Störfaktor der morphometrischen Auswertung ist die Tatsache, dass die transplantierten Lungen nach Entnahme, im Vergleich zu den rechten Kontrolllungen größer sind. Dies ist auf die vorhandenen Zellinfiltrate und Ödeme (Kap. 3.1) zurückzuführen. Die nicht transplantierten, relativ unbeeinträchtigten Lungen hingegen kollabieren. Dieser Effekt hätte durch eine Flüssigkeitsinstillation in den bronchoalveolären Raum vor der Entnahme verringert werden können. Dabei wäre jedoch eventuell die Lokalisation und Dichte der intraalveolären Zellpopulation beeinflusst worden.

Klinische Verlaufskontrollen nach humanen Lungentransplantationen und experimentelle Untersuchungen am Tiermodell werden häufig mittels BAL durchgeführt. Bei anderen Untersuchungen mit der Rattenstammkombination *Brown Norway*→LEW und Verwendung einer BAL, wurde ein Verhältnis T-Lymphozyten zu AM von 3:1 ermittelt [57]. Dieses Ergebnis unterscheidet sich von dem der vorliegenden Arbeit und könnte durch die unterschiedliche Rattenstammkombination sowie verfahrensbedingt begründet sein. Bei der BAL werden lediglich intraluminale bronchoalveoläre Zelltypen gemessen. Stark adhärente Zellen werden jedoch nicht ausgespült. Weiterhin sind Verschiebungen der Zellzusammensetzung zwischen den Kompartimenten nicht nachweisbar.

In dieser Arbeit werden immunhistologische Nachweisverfahren angewendet, um die Zelltypen an ihrem physiologischen beziehungsweise pathophysiologischen Platz nachzuweisen. Dabei werden die Leukozyteninfiltrate der Alveolarsepten mit berücksichtigt. Morphologisch sind die bei der akuten Transplantatabstoßung charakteristischen perivaskulären-/bronchialen Infiltrate [112] zu finden.

Gerade unter pathophysiologischen Gesichtspunkten erscheint zur Beurteilung der Transplantatabstoßung die Auswertung aller Lungenkompartimente (Kap. 1.2 und 1.3) sinnvoll. Um die o.g. verfahrensbedingten Einflussfaktoren so gering wie möglich zu halten, werden nur definierte Areale des Lungengewebes ausgewertet (Kap. 2.6).

4.1.3 Antikörperauswahl

Die von uns verwendeten mAb ED1 und ED2 (Kap. 2.5.4) erlauben einen Überblick über die Makrophagenpopulation der Lunge sowie deren Verteilung. Zum Vergleich werden Lymphozyten mit den mAb R73 und Ox33 detektiert. Als T-Zellnachweis wird der mAb R73 gegen den α/β -TZR [46] verwendet. Die Subpopulation der T-Zellen mit γ/δ -TZR wird vom mAb R73 nicht erfasst. Es werden beim T-Zellnachweis keine Antikörper gegen CD4 und CD8 verwendet, da diese Antigene auch auf M/M vorkommen [36].

Der Versuch des Granulozytennachweises erfolgte im Rahmen der Verfahrensetablierung mit dem mAb RP1 gegen Antigene in zytoplasmatischen Granula neutrophiler Granulozyten [32]. Ein Nachweis von Granulozyten in Paraffinschnitten gelingt mit diesem mAb nicht. Auf den HE-gefärbten histologischen Präparaten sind jedoch keine nennenswerten Granulozytenansammlungen zu sehen.

Bei Untersuchungen an transplantierten Rattennieren wurden neutrophile Granulozyten erst ab dem 5. postoperativen Tag in nennenswerten Mengen bei allogenen Transplantaten nachgewiesen [36]. Zu diesem Zeitpunkt sind die Transplantate der Abstoßungsgruppe bereits terminal geschädigt. Es scheint, dass Granulozyten eher als Reaktion auf bestehende Gewebsnekrosen einwandern und nicht initial an der Transplantatschädigung beteiligt sind [36]. In anderen Untersuchungen wird die Bedeutung der neutrophilen Granulozyten bei primärem Transplantatversagen [17, 66] und bei der chronischen Organabstoßung [23] diskutiert.

Weitere Untersuchung zur Rolle der Granulozyten bei der akuten Abstoßung von Lungentransplantaten sollten folgen. Dabei ist auch die Abgrenzung der allogenen Abstoßungsreaktion von initialen Ischämie-/Reperfusionsschäden von Bedeutung.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Histopathologie

In Phase I befinden sich im Lungengewebe der Abstoßungs- und Kontrollgruppe diffus verteilte einzelne Leukozyten. Dies entspricht dem Stadium A1/B1, teilweise A1/B2. In beiden Gruppen besteht initial ein perivaskuläres Ödem, dies wird in der Kontrollgruppe stetig kleiner, besteht jedoch bis zum Ende des Beobachtungszeitraums fort. Ursächlich für dieses Ödem könnten Ischämie-/Reperfusionsschäden (Kap. 1.4.1) sowie Traumata durch die Operation sein, da sie sowohl bei der isogenen Kontrollgruppe, als auch bei der Abstoßungsgruppe vorkommen. Bei den *in situ* belassenen rechten Lungen sind sie in weit geringerem Maße nachzuweisen. Hierbei spricht die zügige Rückbildung des Ödems bei der isogenen Kontrollgruppe bis zum d 6 für die Vernachlässigbarkeit dieser Faktoren in der vorliegenden Arbeit. Sie sollten aber im mittel- und langfristigen Verlauf nicht außer Acht gelassen werden, da sie als Prädispositionen für das akute und chronische Transplantatversagen diskutiert werden [13, 28].

Weiterhin finden sich kleine perivaskuläre/-bronchiale Leukozyteninfiltrate. Unterscheidet man die Phase I in d 1 und d 2 wird deutlich, dass schon ab d 2 die Dichte der Leukozyteninfiltrate in der Abstoßungsgruppe tendenziell vermehrt ist. Diese Veränderungen könnten durch die Aktivierung von immunkompetenten Zellen wie M/M und T-Lymphozyten, mit Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren, begünstigt werden [24, 68]. Die Expression vieler Mediatoren sinkt nach Reperfusion des Transplantats wieder ab [17].

Bei den Bronchien/Bronchiolen der Abstoßungsgruppe ist initial eine Zunahme des Verhältnisses Becher-/Flimmerzellen nachweisbar. Dieses ist im weiteren Verlauf progredient und erreicht in Phase II im Mittel ein Verhältnis von 1:3. In Phase III ist analog zur beobachtbaren Schädigung des respiratorischen Epithels eine Abnahme zu verzeichnen. Bei der isogenen Kontrollgruppe sowie bei den rechten Kontrolllungen ist im Beobachtungszeitraum keine Becherzellhyperplasie nachweisbar. Das Verhältnis Becher-/Flimmerzellen beträgt hier mit kleinen Schwankungen durchgängig 1:10 bis 1:20 und entspricht dem Normalbefund, bei dem allerdings schon physiologisch eine große Varianz möglich ist [21]. In anderen Studien wird die Trachea von Ratten transplantiert. Hier wird bei Isotransplantaten zwischen dem d 3 und d 10 eine Zunahme der Becherzellichte im Rahmen der epithelialen Reparaturphase

beschrieben. Bei Allotransplantaten kommt es in dieser Studie nach einem initialen Anstieg bis zum d 3, im weiteren Verlauf zwischen dem d 5 und d 12, zur Abnahme der Becherzellichte infolge einer Epithelschädigung [21]. Dieser Verlauf deckt sich bei den Allotransplantaten bis zum d 6 mit unseren Untersuchungen, wobei der bei Isotransplantaten beschriebene Anstieg in unseren Untersuchungen nicht nachgewiesen werden konnte. Im Allgemeinen wird eine Becherzellhyperplasie des respiratorischen Systems bei chronischen Reizen wie z.B. Asthma bronchiale oder COPD beschrieben [78].

Alle weiteren Veränderungen der Transplantatmorphologie in Phase II und III sind auf die Abstoßungsgruppe beschränkt. Bei der isogenen Kontrollgruppe treten bis d 6 keine weiteren wesentlichen Veränderungen auf. Spätere Zeitpunkte werden nicht untersucht. Phase II ist bei der Abstoßungsgruppe durch die Dichtezunahme des Leukozyteninfiltrats gekennzeichnet, welches am d 3 hauptsächlich auf den perivaskulären/-bronchialen Bereich beschränkt ist, sich ab d 4 jedoch auf die Alveolarsepten sowie den Alveolarraum ausbreitet. Intraalveolar sind bis zu 20 µm große Zellen mit mononukleärer Morphologie nachweisbar. Die Ödembewertung ist durch die stetig zunehmende Leukozyteninfiltration nicht mehr möglich. In den Lumina der Bronchien/Bronchiolen ist in den Untersuchungen schwach eosinophil färbendes Plasmaextravasat nachweisbar. Die resultierende bronchiale Obstruktion könnte zur Induktion des Euler-Liljestrand-Mechanismus führen. Dieser beschreibt den Zusammenhang zwischen Ventilation und Perfusion der Lunge, wobei es in einem hypoxischem Lungenabschnitt zur reflektorischen Vasokonstriktion mit Verringerung des Rechts-Links-Shunts kommt [99, 83]. Dieser Effekt wirkt dem Absinken der arteriellen Oxygenierung entgegen. Bei ubiquitärem Auftreten im Bereich des Lungentransplantats können jedoch die Nachteile überwiegen. Dazu zählen die Erhöhung des pulmonalarteriellen Widerstandes mit vermehrter Rechtsherzbelastung und fortschreitender Ischämie der betroffenen Lungenabschnitte [99]. Phase III der Abstoßungsgruppe ist morphologisch durch eine teils massive Leukozyteninfiltration gekennzeichnet, die am d 5 ihren Höhepunkt erreicht. Die Organstruktur ist am d 4 partiell durch Atelektasen beeinträchtigt und in Phase III nahezu zerstört, so dass massive Leukozyteninfiltrate, Nekrosen und Einblutungen das Aussehen der Objekte bestimmen. Es findet sich eine rückläufige Becherzellichte, jedoch partiell durch Mucus obstruierte

Bronchien/Bronchiolen. Die partielle Atelektasenbildung könnte durch diesen Umstand mitbegründet sein.

4.2.2 Transplantatinfiltration

4.2.2.1 ED1⁺ Monozyten/Makrophagen

In gesunden Rattenlungen exprimieren AM und intravaskuläre Monozyten das ED1⁺ Antigen (CD68-artig). Ihre Zahl ist jedoch gering. Demgegenüber ist die Expression von ED1⁺ Antigen bei IM kaum ausgeprägt [16, 19].

In Phase I sind die ED1⁺ Zellen in Alveolarräumen/-septen von Iso-/Allotransplantaten sowie den rechten Kontrolllungen der Transplantatempfänger relativ gleichmäßig verteilt. Diese entsprechen morphologisch AM. In den perivaskulären/-bronchialen Bereichen sind sie nur vereinzelt nachzuweisen und entsprechen vornehmlich intravasalen Monozyten. Bei der isogenen Kontrollgruppe ist am d 2 das Maximum des immunpositiven Flächenanteils von 4,7% erreicht, während dieser in der Abstoßungsgruppe ab d 4 auf > 13% ansteigt (Kap. 3.2.1). In Phase II steigt bei Allotransplantaten die Dichte ED1⁺ Zellen in Alveolarräumen/-septen weiter an. Das ED1⁺ Infiltrat im Alveolarraum besteht aus AM, in den Alveolarsepten hingegen aus intravaskulären Monozyten und IM. Diese lassen sich auf Paraffinschnitten jedoch nicht unterscheiden. Der Durchmesser der farbintensiven ED1⁺ Zellen nimmt in Phase II auf bis 20 µm zu. Während der Abstoßungsreaktion scheint sich der Differenzierungszustand der IM zu ändern, denn die perivaskulären/-bronchialen IM exprimieren in Phase I kaum, jedoch ab Phase II schwach und in Phase III deutlich das ED1⁺ Antigen. Die Bedeutung der Änderung des Differenzierungszustands ist noch ungeklärt. Bei anderen Entzündungsprozessen der Lunge wird eine verstärkte Rekrutierung von intravasalen Monozyten beschrieben [59, 80]. Monozyten sind ED1⁺ und gelten als Vorläuferzellen für IM, AM und DC [76]. Weiterhin gibt es Hinweise, dass ein Teil des immunpositiven Infiltrats in der Abstoßungsgruppe durch die lokale Proliferation von Spender- und Empfängermakrophagen entsteht [82]. Die ebenfalls ED1⁺ DC (Kap. 1.5.1) sind perivaskulär/-bronchial vereinzelt in Phase II nachzuweisen, spielen jedoch in dieser Arbeit bei der Auswertung des immunpositiven Flächenanteils, aufgrund der geringen Fläche, quantitativ kaum eine Rolle. Ihre Funktion als APZ scheint bedeutend [76]. Zu ihrer Rolle bei der akuten Transplantatabstoßung sollten weitere Untersuchungen folgen.

4.2.2.2 ED2⁺ Makrophagen

Im Gegensatz zu den ED1⁺ Zellen sind ED2⁺ Zellen bei Iso- und Allotransplantaten initial nur vereinzelt in Alveolarräumen/-septen zu finden. Kleine Anhäufungen sind perivaskulär/-bronchial nachzuweisen. In gesunden Rattenlungen wird das ED2⁺ Antigen (CD163) von IM, aber nicht von AM exprimiert [103, 19].

Bei der Abstoßungsgruppe nimmt die perivaskuläre/-bronchiale Infiltration in den Phasen I – III stetig zu. Dabei sind ED2⁺ Zellen bis d 4 hauptsächlich auf den perivaskulären/-bronchialen Raum beschränkt und die AM bis dahin weiter ED2⁻. Die peribronchialen Ansammlungen fallen insgesamt geringer aus, bilden jedoch ebenfalls dichte Anhäufungen immunpositiver Zellen. Da bei der Bestimmung des immunpositiven Flächenanteils größere Bronchien und Gefäße gemieden werden, geht diese fokale Anhäufung nicht in die Auswertung ein. Im Lungengewebe steigt die Dichte ED2⁺ Zellen erst ab Phase III deutlich an. Dadurch nimmt die Fläche ED2⁺ Zellen ab d 5 deutlich zu und erreicht am d 6 das Maximum von 14%. Bei der isogenen Kontrollgruppe sowie Normallungen liegt der ED2⁺ Flächenanteil im gesamten Beobachtungszeitraum < 1% (Kap. 3.2.2). Der Anstieg der ED2⁺ Zellen ist scheinbar auf eine Änderung des Differenzierungszustandes von AM zurückzuführen. Die Bedeutung der Differenzierungszustandsänderung ist noch weitgehend ungeklärt. CD163 trägt zur Entgiftung des Körpers von oxidativ toxischem Hämoglobin bei. Weiterhin wird eine antiinflammatorische Wirkung auf Makrophagen beschrieben [65]. Eine Rolle bei der Limitierung der Immunantwort ist möglich, jedoch sind die Allotransplantate zum Zeitpunkt der maximalen CD163-Expression schon irreversibel geschädigt, sodass diese mögliche antiinflammatorische Wirkung in unserem Modell keinen Einfluss auf das Transplantatüberleben hat.

4.2.2.3 R73⁺ T-Lymphozyten

Bei der T-Zelldetektion wird ein mAb gegen den α/β -TZR (konstante Region der β -Kette) verwandt [46], somit wird die Subpopulation der γ/δ -T-Zellen nicht erfasst (Kap. 1.4.3).

In Phase I sind R73⁺ Zellen im Lungengewebe von Iso- und Allotransplantaten gleichmäßig verteilt. Bei der isogenen Kontrollgruppe kommt es zu keiner Änderung des initialen Befundes, der immunpositive Flächenanteil bleibt durchgängig < 1%. In der Abstoßungsgruppe entspricht die zeitliche und

örtliche Verteilung in den Lungenkompartimenten den ED1⁺ Zellen. Allerdings liegt der immunpositive Flächenanteil während des gesamten Beobachtungszeitraums deutlich unter dem der ED1⁺ M/M (Kap. 3.2.3). Bei der Abstoßungsgruppe in Phase II kommt es zunächst zur Dichtezunahme R73⁺ Zellen in den perivaskulären Bereichen sowie am d 4 zur fokalen Ausweitung des R73⁺ Infiltrats in die Alveolarsepten. Dabei verläuft die Infiltration im Vergleich zu den ED1⁺ Zellen um einen Tag verzögert. Peribronchial fallen dichte Ansammlungen immunpositiver Zellen auf. Am d 5 wird mit einem Flächenanteil von 3% das Maximum im Beobachtungszeitraum erreicht. In stark verdichteten oder durch Nekrosen beeinträchtigten Bereichen kommt es am Ende von Phase III zu einer Abnahme der Dichte R73⁺ Zellen (Kap. 3.2.3). Perivaskuläre immunpositive Infiltrate finden sich in der Abstoßungsgruppe, jedoch nicht in der isogenen Kontrollgruppe. Bei der allogenen Transplantation können T-Zellen über die direkte oder indirekte Fremderkennung eine Immunantwort auslösen (Kap. 1.4.2). Sie bestimmen durch Sekretion von Zytokinen die endgültige Differenzierung und Proliferation einer Vielzahl von Immunzellen. Unter anderem erhöhen sie die Expression von Adhäsionsmolekülen und steigern die Rekrutierung von M/M (Kap. 1.4.2 und 1.5). Dies begünstigt die Entstehung perivaskulärer Leukozyteninfiltrate und kann zur weiteren Gewebsschädigung führen [14]. Tc-Zellen können allogene Zellen zerstören. T_H-Zellen sezernieren Mediatoren mit pro- und antiinflammatorischen Eigenschaften [86, 91].

Aktivierte T-Zellen nehmen durch ihre Vermittlerfunktion und ihre zytotoxischen Eigenschaften eine zentrale Rolle bei der zellvermittelten Immunantwort ein [63, 88, 33].

4.2.2.4 Ox33⁺ B-Lymphozyten

Ox33⁺ Zellen sind in der isogenen Kontrollgruppe vereinzelt und diffus verteilt nachzuweisen. Das Maximum des immunpositiven Flächenanteils wird am d 3 mit 0,3% erreicht und fällt in Phase III auf < 0,1% ab. In der Abstoßungsgruppe finden sich ebenfalls vereinzelt und diffus verteilte Ox33⁺ Zellen in perivaskulären/-bronchialen Bereichen und den Alveolarsepten. Es besteht in Phase II eine minimale Dichtezunahme in den perivaskulären/-bronchialen Bereichen. Am d 3 wird mit 0,4%, das Maximum erreicht. In stark verdichteten oder durch Nekrosen beeinträchtigten Bereichen während Phase III lassen sich

kaum noch immunpositive Zellen nachweisen. In unseren Untersuchungen spielen Ox33⁺ B-Lymphozyten mit < 1 % eine quantitativ untergeordnete Rolle. Mit fortschreitender Transplantatzerstörung sinkt die Dichte Ox33⁺ B-Lymphozyten weiter ab (Kap. 3.2.4). Zur Bedeutung der B-Lymphozyten bei der Transplantatabstoßung sollten weitere Untersuchungen folgen.

4.2.3 Rechte Kontrolllungen

In den ebenfalls ausgewerteten, nicht transplantierten rechten Lungen der Abstoßungs- und Kontrollgruppe, finden sich keine substantiellen pathologischen Veränderungen. Das perivaskuläre/-bronchiale Ödem ist im Vergleich zu den transplantierten Lungen wesentlich geringer ausgeprägt oder fehlt ganz. Die zelltypabhängige Leukozyteninfiltration der rechten Lungen findet in weitaus geringerem Maße statt und entspricht weitgehend der von Normallungen.

Die genannten fulminanten Veränderungen der Abstoßungsgruppe sind auf die transplantierten linken Lungen beschränkt. Bezüglich des zeitlichen Infiltrationsverlaufs findet sich ein den linken Lungen entsprechendes Bild bei den R73⁺ Zellen. Der immunpositive Flächeninhalt steigt ebenfalls ab d 3 an und erreicht am d 5 das Maximum. In den rechten Lungen wird jedoch im Vergleich zu den Linken nur etwa ein Drittel der immunpositiven Zelldichte erreicht (Kap 3.4).

Die Tatsache, dass auch die rechten nativen Empfängerlungen im Verlauf der akuten Transplantatabstoßung durch T-Lymphozyten infiltriert wird, ließe sich mit einem organspezifischen *homing* aktivierter T-Lymphozyten erklären. Es ist jedoch sehr umstritten, ob organspezifisches *homing* im lebenden Organismus eine Rolle spielt [108]. Eine weitere Möglichkeit, diese Beobachtung zu erklären, wäre die Beteiligung autoreaktiver T-Lymphozyten an der akuten Abstoßung von Lungentransplantaten, wie sie bereits für den Menschen beschrieben wurde [109].

Auch hier sind weitere Untersuchungen notwendig, um den Mechanismus und die Bedeutung der T-Zell-Infiltration der nativen Lungen aufzuklären.

4.3 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Studie werden histopathologische Veränderungen im Zeitverlauf nach isogener und allogener Transplantation von Rattenlungen untersucht. Sie schafft eine Grundlage für die Beurteilung experimenteller Lungentransplantate und dient unter anderem als Vorarbeit für zukünftige therapeutische Studien. Die Ergebnisse zeigen im Verlauf der akuten Abstoßung allogener Rattenlungen eine klare quantitative Dominanz von IM und AM gegenüber von T- und B-Lymphozyten. In gesunden Rattenlungen exprimieren die meisten IM kein CD68-artiges Antigen (ED1⁻) wohl aber CD163 (ED2⁺). AM hingegen sind ED1⁺/ED2⁻. Perivaskuläre/-bronchiale IM werden zunehmend ED1⁺ und AM zeitlich verzögert ED2⁺. Die Bedeutung der jeweiligen Änderung des Differenzierungszustands ist im Einzelnen noch ungeklärt. Der CD163-Expression von Makrophagen wird eine Rolle bei antiinflammatorischen Prozessen zugeschrieben.

Diese Ergebnisse und Daten aus der Literatur legen die Schlussfolgerung nahe, dass Makrophagen bei der akuten Abstoßung von Lungentransplantaten eine wichtige Rolle spielen. Einerseits können Makrophagen vom Spender und vom Empfänger als APZ fungieren und CD4⁺ T-Zellen, die die Spezifität der Abstoßung vermitteln, aktivieren. Aktivierte T-Zellen schütten wiederum Zytokine aus, die Makrophagen zu Effektorzellen reifen lassen. Diese können das Transplantatgewebe durch eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen schädigen. Andererseits können Makrophagen auch antiinflammatorisch und immunregulierend wirken.

Aufgrund ihres einerseits destruktiven und andererseits protektiven Potentials bieten Makrophagen einen vielversprechenden Ansatzpunkt zur Entwicklung neuer Therapien der akuten Transplantatabstoßung. Der Versuch, zytotoxische Mechanismen von Makrophagen direkt zu inhibieren, könnte an deren Vielzahl scheitern. Ein möglicher Ansatz wäre jedoch die Modulation des Aktivierungszustandes von Transplantatmakrophagen. Dabei könnten antiinflammatorische und immunregulierende Eigenschaften gefördert und gleichzeitig gewebeschädigende Eigenschaften unterdrückt werden.

Zusammenfassung

5.1 Deutsch

Monozyten/Makrophagen übernehmen wichtige Funktionen bei der Regulation der unspezifischen und spezifischen Immunantwort. Sie verfügen über proinflammatorische und zytotoxische Eigenschaften, die zur Transplantaterstörung beitragen können. Monozyten/Makrophagen wirken andererseits auch antiinflammatorisch sowie immunregulierend und erfüllen wichtige Funktionen bei der Reorganisation geschädigter Gewebe. Damit bieten sie einen vielversprechenden Ansatzpunkt zur Entwicklung neuer Therapien der Transplantatabstoßung.

In der vorliegenden Studie wird der Zeitverlauf der Histopathologie sowie der Infiltration allogener und isogener Rattenlungentransplantate durch mononukleäre Leukozyten untersucht. Die Untersuchungen basieren auf orthotopen Lungentransplantationen von männlichen Inzuchtratten des Stammes *Dark Agouti* auf *Lewis*-Ratten. Zur Kontrolle werden *Lewis*-Lungen isogen transplantiert, um die durch die Operation ausgelösten Veränderungen von den abstoßungsbedingten Veränderungen der allogenen Gruppe zu unterscheiden. Untersucht werden Lungentransplantate, die in den ersten 6 postoperativen Tagen in Tagesabständen entnommen wurden. Hämatoxylin-Eosin gefärbte Paraffinschnitte werden nach einem etablierten histopathologischen Klassifikationssystem ausgewertet. Zudem wird immunhistologisch die Transplantatinfiltration durch mononukleäre Leukozyten untersucht. Dazu wird densitometrisch der prozentuale Anteil der immunpositiven Fläche in zufällig ausgewählten Bereichen der Lungenschnitte gemessen.

Die histopathologischen Veränderungen sind initial moderat und aufgrund der Reversibilität in der isogenen Kontrollgruppe vermutlich auf die Operation zurückzuführen. Weitere Veränderungen, wie die stetige Zunahme perivaskulärer/-bronchialer Leukozyteninfiltrate oder die Becherzellhyperplasie des respiratorischen Epithels, sind auf allogene Transplantate beschränkt. Ab Tag 4 kommt es zu einer fokalen Leukozyteninfiltration der Alveolarräume, die an Tag 5 ihr Maximum erreicht. Es bestimmen massive Leukozyteninfiltrate, Nekrosen und Einblutungen das Aussehen der allogenen Transplantate.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zeigen für den gesamten Verlauf der akuten Transplantatabstoßung allogener Rattenlungen eine quantitative Dominanz von Gewebe- und Alveolarmakrophagen gegenüber T- und B-Lymphozyten. Neben der quantitativen Dominanz kommt es während der Abstoßungsreaktion zu einer Änderung des Differenzierungszustandes von Gewebe- und Alveolarmakrophagen. In gesunden Rattenlungen exprimieren die meisten Gewebemakrophagen kein CD68-artiges Antigen (ED1⁻) wohl aber CD163 (ED2⁺). Alveolarmakrophagen hingegen sind ED1⁺/ED2⁻. Perivaskuläre/-bronchiale Gewebemakrophagen werden ab Tag 3 zunehmend ED1⁺. Dies führt zum Anstieg des immunpositiven Flächenanteils bis auf > 13% ab d 4. Zeitlich verzögert exprimieren Alveolarmakrophagen ab Tag 5 zunehmend CD163 (ED2⁺). Es resultiert ein Anstieg des immunpositiven Flächenanteils bis Tag 6 auf 14%. Der CD163-Expression von Makrophagen wird eine Bedeutung bei antiinflammatorischen Prozessen zugeschrieben. Die Funktion der veränderten Antigenexpression von Makrophagen in Lungentransplantaten ist jedoch noch unbekannt. Im Gegensatz zu den Makrophagen erreicht der immunpositive Flächenanteil der T-Lymphozyten (α/β -TZR/R73⁺) am Tag 5 nur 3%. B-Lymphozyten (CD45RA/Ox33⁺) sind noch in geringer Zahl nachweisbar.

Die vorliegende Studie schafft eine Grundlage für die histopathologische Beurteilung experimenteller Lungentransplantate und dient damit als Vorarbeit für zukünftige Untersuchungen. Diese können der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze, zur Prävention oder Heilung der akuten Abstoßung von Lungentransplantaten dienen.

5.2 Englisch

Monocytes/macrophages play an important role in the regulation of unspecific and specific immune responses. Their pro-inflammatory and cytotoxic properties may contribute to the destruction of allografts. However, monocytes/macrophages also exert anti-inflammatory and regulating functions and are involved in the reorganisation of damaged tissue. Therefore, they may be a promising target for the development of new therapies preventing transplant rejection. The present study investigates the time course of graft histopathology and infiltration by mononuclear leukocytes in experimental lung allografts and isografts.

Dark Agouti lungs are orthotopically grafted to Lewis recipients. As a control, isogenic lung transplantations between *Lewis*- rats are performed, in order to differentiate between tissue alterations caused by surgery and those by rejection in the allogenic group. Grafts were removed daily until day 6 post-transplantation. Hematoxylin-Eosin stained paraffin sections are assessed according to an established histopathological classification. In addition, transplant infiltration by mononuclear leukocytes is investigated by immunohistological methods, followed by densitometry to measure the immunopositive area in randomly chosen parts of the sections.

Initially, the histopathological changes were moderate, reversibel in isografts and, probably induced by surgery. Further changes like increased perivascular/-bronchial leukocyte infiltrates or goblet cell hyperplasia of respiratory epithelium were limited to allografts. On day 4, focal intraalveolar infiltration is seen, which peaks on day 5. At that time, allografts exhibit massive leukocytic infiltrates, patches of necrotic lesions and hemorrhage.

This study reveals a quantitative dominance of macrophages in comparison to T- and B-lymphocytes during all phases of acute transplant rejection. Furthermore, changes in the differentiation of tissue and alveolar macrophages are noticed. In healthy rat lungs, most interstitial macrophages are negative for the CD68-like antigen (ED1⁻) but express CD163 (ED2⁺). From day 3 onwards, perivascular/-bronchial tissue macrophages progressively become ED1⁺ and the ED1-immunopositive area attains > 13% by day 4. Starting on day 5, alveolar macrophages increasingly express CD163 (ED2⁺), and the ED2-immunopositive area reaches up to 14% by day 6. The expression of CD163 is known to be involved in anti-inflammatory processes, but the functional relevance of the observed changes in the expression patterns after lung transplantation remain to be established. In comparison, T-lymphocytes (R73⁺) make up only 3% of the area on allograft sections by day 5 post-transplantation. The abundance of B-lymphocytes (CD45RA/Ox33⁺) even remains below this level.

The present study provides a basis for the histopathological evaluation of experimental lung allografts and will be useful for future investigations aiming at the development of novel therapeutic strategies to prevent or cure acute lung allograft rejection.

6 Verzeichnisse

6.1 Literatur

1. **Al-Mehdi AB, Shuman H, Fisher AB (1997).** Intracellular generation of reactive oxygen species during nonhypoxic lung ischemia. *Am J Physiol* 272: 294-300.
2. **Bauer J, Sminia T, Wouterlood FG, Dijkstra CD (1994).** Phagocytic activity of macrophages and microglial cells during the course of acute and chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* 38: 365-375.
3. **Benninghoff A, Drenckhahn D (2004).** Anatomie 2: 16. Auflage, Urban & Fischer, ISBN-13: 978-3437423512.
4. **Bhabra MS, Hopkinson DN, Shaw TE, Hooper TL (1996).** Critical importance of the first 10 minutes of lung graft reperfusion after hypothermic storage. *Ann Thorac Surg* 61: 1631-1635.
5. **Blöcher S, Wilker S, Sucke J, Pfeil U, Dietrich H, Weimer R, Steger K, Kaufmann A, Hirschburger M, Plötz C, Padberg W, Grau V (2007).** Acute rejection of experimental lung allografts: characterization of intravascular mononuclear leukocytes. *Clin Immunol* 124: 98-108.
6. **Böcker W, Denk H, Heitz PhU (2000).** Pathologie: 4. Auflage, Urban & Fischer, ISBN-13: 978-3437423826.
7. **Boehler A, Kesten S, Weder W, Speich R (1998).** Bronchiolitis obliterans after lung transplantation. *Chest* 114: 1411-1426.
8. **Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A (2000).** Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 12: 64-76.
9. **Buechler C, Ritter M, Orso E, Langmann T, Klucken J, Schmitz G (2000).** Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol* 67: 97-103.
10. **Carlos TM, Harlan JM (1995).** Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84: 2068-2101.
11. **Charo IF, Ransohoff RM (2006).** The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 354: 610-621.
12. **Choi JK, Kearns J, Palevsky HI, Montone KT, Kaiser LR, Zmijewski CM, Tomaszewski JE (1999).** Hyperacute rejection of a pulmonary allograft. Immediate clinical and pathologic findings. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 1015-1018.

13. **Christie JD, Edwards LB, Aurora P, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, Taylor DO, Kucheryavaya AY, Hertz MI (2008).** Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-fifth Official Adult Lung and Heart/Lung Transplantation Report-2008. *J Heart Lung Transplant* 27: 957-969.
14. **Colvin RB, Smith RN (2005).** Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat Rev Immunol* 5: 807-817.
15. **Cotts WG, Johnson MR (2001).** The challenge of rejection and cardiac allograft vasculopathy. *Heart Fail Rev* 6: 227-240.
16. **Damoiseaux JG, Döpp EA, Calame W, Chao D, MacPherson GG, Dijkstra CD (1994).** Rat macrophage lysosomal membrane antigen recognized by monoclonal antibody ED1. *Immunology* 83: 140-147.
17. **de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S (2003).** Ischemia-reperfusion induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 167: 490–511.
18. **del Rio ML, Rodriguez-Barbosa JI, Kremmer E, Forster R (2007).** CD103- and CD103+ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 178: 6861-6866.
19. **Dijkstra CD, Döpp EA, Joling P, Kraal G (1985).** The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2, and ED3. *Immunology* 54: 589-599.
20. **Dijkstra CD, Döpp EA, van den Berg TK, Damoiseaux JG (1994).** Monoclonal antibodies against rat macrophages. *J Immunol Methods* 174: 21-23.
21. **Dosanjh A, Wan B, Ikonen T, Boeke K, Morris RE (2001).** Airway goblet cells and respiratory epithelial injury in an animal model of obliterative airways disease (OAD). *Am J Transplant* 1: 321-324.
22. **Droste A, Sorg C, Hogger P (1999).** Shedding of CD163, a novel regulatory mechanism for a member of the scavenger receptor cysteine-rich family. *Biochem Biophys Res Commun* 256: 110-113.
23. **Elssner A, Vogelmeier C (2001).** The role of neutrophils in the pathogenesis of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *Transpl Infect Dis* 3: 168-176.
24. **Eppinger MJ, Deeb GM, Bolling SF, Ward PA (1997).** Mediators of ischemia reperfusion injury of rat lung. *Am J Pathol* 150: 1773-1784.
25. **Estenne M, Maurer JR, Boehler A, Egan JJ, Frost A, Hertz M, Mallory GB, Snell GI, Yousem S (2002).** Bronchiolitis obliterans syndrome 2001: an update of the diagnostic criteria. *J Heart Lung Transplant* 21:297-310.

26. **Ferrari-Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG, Dayer JM (2001).** Human lung tissue macrophages, but not alveolar macrophages, express matrix metalloproteinases after direct contact with activated T lymphocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24: 442-451.
27. **Fiser SM, Tribble CG, Long SM, Kaza AK, Cope JT, Laubach VE, Kern JA, and Kron IL (2001).** Lung transplant reperfusion injury involves pulmonary macrophages and circulating leukocytes in a biphasic response. *J Thorac Cardiovasc Surg* 121: 1069-1075.
28. **Fiser SM, Tribble CG, Long SM, Kaza AK, Kern JA, Jones DR, Robbins MK, Kron IL (2002).** Ischemia-reperfusion injury after lung transplantation increases risk of late bronchiolitis obliterans syndrome. *Ann Thorac Surg* 73: 1041-1047.
29. **Fliegert FG, Tschernig T, Pabst R (1996).** Comparison of lymphocyte subsets, monocytes, and NK cells in three different lung compartments and peripheral blood in the rat. *Exp Lung Res* 22: 677-690.
30. **Gordon S (2003).** Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3: 23-35.
31. **Gordon S, Taylor PR (2005).** Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5: 953-964.
32. **Gotoh S, Itoh M, Fujii Y, Arai S, Sendo F (1986).** Enhancement of the expression of a rat neutrophil-specific cell surface antigen by activation with phorbol myristate and concanavalin A. *J Immunol* 137: 643-650.
33. **Gould DS, Auchincloss H Jr (1999).** Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. *Immunol Today* 20: 77-82.
34. **Grage-Griebenow E, Zawatzky R, Kahlert H, Brade L, Flad H, Ernst M (2001).** Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64(+) /CD16(+) blood monocytes. *Eur J Immunol* 31: 48-56.
35. **Gratchev A, Guillot P, Hakiy N, Politz O, Orfanos CE, Schledzewski K, Goerdts S (2001).** Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein beta1G-H3. *Scand J Immunol* 53: 386-392.
36. **Grau V, Gemsa D, Steiniger B, Garn H (2000).** Chemokine expression during acute rejection of rat kidneys. *Scand J Immunol* 51: 435-440.
37. **Grau V, Stehling O, Garn H, Steiniger B (2001).** Accumulating monocytes in the vasculature of rat renal allografts: Phenotype, cytokine, inducible NO-synthase, and tissue factor mRNA expression. *Transplantation* 71: 37-46.
38. **Greaves DR, Schall TJ (2001).** Chemokines and myeloid cell recruitment. *Microbes Infect* 2: 331-336.

39. **Heemann UW, Tullius SG, Azuma H, Kupiec-Weglinsky J, Tilney NL (1994).** Adhesion molecules and transplantation. *Ann Surg* 219: 4-12.
40. **Hiller AS, Tschernig T, Kleemann WJ, Pabst R (1998).** Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) and larynx-associated lymphoid tissue (LALT) are found at different frequencies in children, adolescents and adults. *Scand J Immunol* 47: 159-162.
41. **Högger P, Dreier J, Droste A, Buck F, Sorg C (1998).** Identification of the integral membrane protein RM3/1 on human monocytes as a glucocorticoid-inducible member of the scavenger receptor cysteine-rich family (CD163). *J Immunol* 161: 1883-1890.
42. **Högger P, Sorg C (2001).** Soluble CD163 inhibits phorbol ester-induced lymphocyte proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 288: 841-843.
43. **Holt PG, Haining S, Nelson DJ, Sedgwick JD (1994).** Origin and steady-state turnover of class II MHCbearing dendritic cells in the epithelium of the conducting airways. *J Immunol* 153: 256-261.
44. **Holt PG, Stumbles PA (2000).** Characterization of dendritic cell populations in the respiratory tract. *J Aerosol Med* 13: 361-367.
45. **Hume DA (2006).** The mononuclear phagocyte system. *Curr Opin Immunol* 18: 49-53.
46. **Hünig T, Wallny HJ, Hartley JK, Lawetzky A, Tiefenthaler G (1989).** A monoclonal antibody to a constant determinant of the rat T cell antigen receptor that induces T cell activation. Differential reactivity with subsets of immature and mature T lymphocytes. *J Exp Med* 169: 73-86.
47. **Iadocicco K, Monteiro LH, Chaui-Berlinck JG (2002).** A theoretical model for estimating the margination constant of leukocytes. *BMC Physiol* 2: 3.
48. **Izbicki G, Shitrit D, Aravot D, Sulkes J, Saute M, Sahar G, Kramer MR (2002).** Improved survival after lung transplantation in patients treated with tacrolimus/mycophenolate mofetil as compared with cyclosporine/azathioprine. *Transplant Proc* 34: 3258-3259.
49. **Janeway CA jr, Travers P, Walport M, von Shlomchik M (2002).** Immunobiology: 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag. ISBN-13: 978-3827410795.
50. **Johnston RB jr (1988).** Current concepts: immunology. Monocytes and macrophages. *N Engl J Med* 318: 747-752.
51. **Kaplanski G, Marin V, Fabrigoule M, Boulay V, Benoliel AM, Bongrand P, Kaplanski S, Farnarier C (1998).** Thrombin-activated human endothelial cells support monocyte adhesion in vitro following expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1;CD54) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1;CD106). *Blood* 92:1259-267.

52. **Kayano K, Toda K, Naka Y, Pinsky DJ (1999).** Identification of optimal conditions for lung graft storage with Euro-Collins solution by use of a rat orthotopic lung transplant model. *Circulation* 100: 257-261.
53. **Keller CA, Cagle PT, Brown RW, Noon G, Frost AE (1995).** Bronchiolitis obliterans in recipients of single, double, and heart-lung transplantation. *Chest* 107: 973-980.
54. **Kelly RF (2000).** Current strategies in lung preservation. *J Lab Clin Med* 136: 427-440.
55. **Keshavjee SH, Yamazaki F, Yokomise H, Cardoso PF, Mullen JB, Slutsky AS and Patterson GA (1992).** The role of dextran 40 and potassium in extended hypothermic lung preservation for transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 103: 314-325.
56. **King RC, Binns OA, Rodriguez F, Kanithanon RC, Daniel TM, Spotnitz WD, Tribble CG, Kron IL (2000).** Reperfusion injury significantly impacts clinical outcome after pulmonary transplantation. *Ann Thorac Surg* 69: 1681-1685.
57. **Kondo T, Wu GD, Saito R, Marchevsky AM, Prehn J, Matloff JM, Waters PF, Jordan SC (1993).** Immunocytologic analysis of cells obtained from bronchoalveolar lavage in a model of rat lung allograft rejection. *J Surg Res* 55: 351-356.
58. **Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, Moestrup SK (2001).** Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 409: 198-201.
59. **Landsmann L, Varol C, Jung S (2007).** Distinct differentiation potential of blood monocyte subsets in the lung. *J Immunol* 178: 666-670.
60. **Luettig B, Kaiser M, Bode U, Bell EB, Sparshott SM, Bette M, Westermann J (2001).** Naive and memory T cells migrate in comparable numbers through the normal rat lung only effector T cells accumulate and proliferate in the lamina propria of the bronchi. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25: 69-77.
61. **Mantovani A, Sica A, Locati M (2007).** New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur J Immunol* 37: 14-16.
62. **Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M (2004).** The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25: 677-686.
63. **Martinu T, Chen DF, Palmer SM (2008).** Acute Rejection and Humoral Sensitization in Lung Transplant Recipients. *Am J Respir Crit Care Med* 177: 1033-1040.

64. **Mizuta T, Kawaguchi A, Nakahara K, Kawashima Y (1989).** Simplified rat lung transplantation using a cuff technique. *J Thorac Cardiovasc Surg* 97: 578-581.
65. **Moestrup SK, Møller HJ (2004).** CD163: a regulated hemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response. *Ann Med* 36: 347-354.
66. **Moore TM, Khimenko P, Adkins WK, Miyasaka M, Taylor AE (1995).** Adhesion molecules contribute to ischemia and reperfusion-induced injury in the isolated rat lung. *J Appl Physiol* 78: 2245-2252.
67. **Muller WA, Randolph GJ (1999).** Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes. *J Leukoc Biol* 66: 698-704.
68. **Naidu BV, Krishnadasan B, Byrne K, Farr AL, Rosengart M, Verrier ED, Mulligan MS (2002).** Regulation of chemokine expression by cyclosporine A in alveolar macrophages exposed to hypoxia and reoxygenation. *Ann Thorac Surg* 74: 899-905.
69. **Ono K, Sone Y, Irie T, Ohnuki T and Nitta S (1998).** Does potassium ion concentration affect lung preservation? *Surg Today* 28: 192-196.
70. **Pabst R, Gehrke I (1990).** Is the bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) an integral structure of the lung in normal mammals, including humans? *Am J Respir Cell Mol Biol* 3: 131-135.
71. **Pabst R, Tschernig T (1995).** Lymphocytes in the lung: an often neglected cell. Numbers, characterization and compartmentalization. *Anat Embryol* 192: 293-299.
72. **Pabst R, Tschernig T (1997).** Lymphocyte dynamics: caution in interpreting BAL numbers. *Thorax* 52: 1078-1080.
73. **Pattison JM, Krensky AM (1997).** New insights into mechanisms of allograft rejection. *Am J Med Sci* 313: 257-263.
74. **Randolph DA, Carrutthers CJL, Szabo SJ, Murphy KM, Chaplin DD. (1999).** Modulation of airway inflammation by passive transfer of allergen-specific Th1 and Th2 cells in a mouse model of asthma. *J Immunol* 162: 2375-2383.
75. **Randolph DA, Stephens R, Curruthers CJ, Chaplin DD (1999).** Cooperation between TH1 and Th2 cells in a murine model of eosinophilic airway inflammation. *J Clin Invest* 104: 1021-1029.
76. **Randolph GJ, Jakubzick C, Qu C (2008).** Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells. *Curr Opin Immunol* 20: 52-60.
77. **Roebuck KA, Finnegan A (1999).** Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J Leukoc Biol* 66: 876-88.

78. **Rogers DF (2003).** The airway goblet cell. *Int J Biochem Cell Biol* 35: 1-6.
79. **Sarrias MR, Grønlund J, Padilla O, Madsen J, Holmskov U, Lozano F (2004).** The Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR) domain: an ancient and highly conserved protein module of the innate immune system. *Crit Rev Immunol* 24: 1-37.
80. **Sawyer RT (1986).** The ontogeny of pulmonary macrophages in parabiotic mice. *J Leukoc Biol* 40: 347-354.
81. **Schiebler TH, Schmidt W (2003).** Anatomie: 8. Auflage. Springer-Verlag. ISBN-13: 978-3540426608.
82. **Schmidt A, Sucke J, Fuchs-Moll G, Freitag P, Hirschburger M, Kaufmann A, Garn H, Padberg W, Grau V (2007).** Macrophages in experimental rat lung isografts and allografts: infiltration and proliferation in situ. *J Leukoc Biol* 81: 186-194.
83. **Schmidt RF, Thews G, Lang F (2000).** Physiologie des Menschen: 28. Auflage. Springer-Verlag. ISBN-13: 978-3540667339.
84. **Scriba A, Grau V, Celik I, Stehling O, Schneider M, Steiniger B (1997).** Expression of NKR-P1, CD8 and CD43 by rat monocytes during severe immune reactions in vivo. *Immunobiology* 197: 226-226.
85. **Sharples LD, McNeil K, Stewart S, Wallwork J (2002).** Risk factors for bronchiolitis obliterans: asystematic review of recent publications. *J Heart Lung Transplant* 21: 271-281.
86. **Shresta S, Pham CT, Thomas DA, Graubert TA, Ley TJ (1998).** How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol* 10: 581-587.
87. **Simonson MS, Robinson AV, Schulak JA, Hricik DE (2002).** Inhibition of endothelin-1 improves survival and vasculopathy in rat cardiac transplants treated with cyclosporine. *Transplantation* 73: 1054-1059.
88. **Snyder LD, Palmer SM (2006).** Immune mechanisms of lung allograft rejection. *Semin Respir Crit Care Med* 27: 534-543.
89. **Song E, Ouyang N, Horbelt M, Antus B, Wang M, Exton MS (2000).** Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cell Immunol* 204: 19-28.
90. **Speich R, Boehler A, Zalunardo MP, Stocker R, Russi EW, Weder W (2001).** Improved results after lung transplantation-analysis of factors. *Swiss Med Wkly* 131: 238-245.
91. **Squier MKT, Cohen JJ (1994).** Cell-mediated cytotoxic mechanisms. *Curr Opin Immunol* 6: 447-452.

92. **Steinman RM, Hemmi H (2006).** Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 311: 17-58.
93. **Stewart S, Fishbein MC, Snell GI, Berry GJ, Boehler A, Burke MM, Glanville A, Gould FK, Magro C, Marboe CC, McNeil KD, Reed EF, Reinsmoen NL, Scott JP, Studer SM, Tazelaar HD, Wallwork JL, Westall G, Zamora MR, Zeevi A, Yousem SA (2007)** Revision of the 1996 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of lung rejection. *J Heart Lung Transplant* 26: 1229-1242.
94. **Sulahian TH, Högger P, Wahner AE, Wardwell K, Goulding NJ, Sorg C, Droste A, Stehling M, Wallace PK, Morganelli PM, Guyre PM (2000).** Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155. *Cytokine* 12: 1312-1321.
95. **Sundaresan S, Trulock EP, Mohanakumar T, Cooper JD, Patterson GA (1995).** Prevalence and outcome of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. Washington University Lung Transplant Group. *Ann Thorac Surg* 60: 1341-1347.
96. **Svanborg C, Godaly G, Hedlund M (1999).** Cytokine responses during mucosal infections : role in disease pathogenesis and host defence. *Curr Opin Microbiol* 2: 99-105.
97. **Takahashi K, Naito M, Takeya M (1996).** Development and heterogeneity of macrophages and their related cells through their differentiation pathways. *Pathol Int* 46: 473-485.
98. **Thabut G, Brugiere O, Leseche G, Stern JB, Fradj K, Herve P, Jebrak G, Marty J, Fournier M, Mal H (2001).** Preventive effect of inhaled nitricoxide and pentoxifylline on ischemia/reperfusion injury after lung transplantation. *Transplantation* 71: 1295-1300.
99. **Thiemes Innere Medizin (1999).** TIM: 1. Auflage. Thieme Verlag. ISBN-13: 978-3131123619.
100. **Trombetta ES, Mellman I (2005).** Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol* 23: 975-1028.
101. **Tschernig T, Boeke K, Steinhoff G, Wonigeit K, Pabst R, Westermann J (1997).** The lung as a source and a target organ for T- and B-lymphocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17: 414-421.
102. **Tschernig T, Pabst R (2000).** Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) is not present in the normal adult lung but in different diseases. *Pathobiology* 68: 1-8.
103. **van den Berg TK, Döpp EA, Dijkstra CD (2001).** Rat macrophages: membrane glycoproteins in differentiation and function. *Immunol Rev* 184: 45-57.

104. **van Furth R, Sluiter W (1986).** Distribution of blood monocytes between a marginating and a circulating pool. *J Exp Med* 163: 474-479.
105. **Van Kessel KP, Verhoef J (1990).** A view to a kill: cytotoxic mechanisms of human polymorphonuclear leukocytes compared with monocytes and natural killer cells. *Pathobiology* 58: 249-264.
106. **Vestweber D (2007).** Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium. *Immunol Rev* 218: 178-196.
107. **Ware LB, Matthay MA (2000).** The Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med* 342: 1334-1349.
108. **Westermann J, Engelhardt B, Hoffmann JC (2001).** Migration of T cells in vivo: molecular mechanisms and clinical implications. *Ann Intern Med* 135: 279-295.
109. **Wilkes DS, Egan TM, Reynolds HY (2005).** Lung transplantation: opportunities for research and clinical advancement. *Am J Respir Crit Care Med* 172: 944-955.
110. **Woollett GR, Barclay AN, Puklavec M, Williams AF (1985).** Molecular and antigenic heterogeneity of the rat leukocyte-common antigen from thymocytes and T and B lymphocytes. *Eur J Immunol* 15:168-173.
111. **Wynn TA (2004).** Fibrotic disease and the Th1/Th2 paradigm. *Nat Rev Immunol* 4: 583-594.
112. **Yousem SA, Berry GJ, Cagle PT, Chamberlain D, Husain AN, Hruban RH, Marchevsky A, Otori NP, Ritter J, Stewart S, Tazelaar HD (1996).** Revision of the 1990 working formulation for the classification of pulmonary allograft rejection: lung rejection study group. *J Heart Lung Transplant* 15: 1-15.
113. **Ziegler-Heitbrock L (2007).** The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* 81: 584-592.
114. **Zwadlo G, Voegeli R, Osthoff KS, Sorg C (1987).** A monoclonal antibody to a novel differentiation antigen on human macrophages associated with the down-regulatory phase of the inflammatory process. *Exp Cell Biol* 55: 295-304.

6.2 Abbildungen

	Seite
Abb. 1-1 Todesursachen nach Lungentransplantation.....	2
Abb. 2-1 „Anastomosen cuff“.....	22
Abb. 2-2 Bindungsfolge Primär-/Sekundärantikörper sowie unspezifische Bindungen.....	26
Abb. 2-3 Prinzip der ABC-Methode.....	27
Abb. 2-4 Prinzip der EnVision™ Peroxidase-Methode.....	27
Abb. 3-1 HE gefärbte Paraffinschnitte von allogenen DA→LEW und isogenen LEW→LEW transplantierten Rattenlungen.....	37
Abb. 3-2 Flächenanteil ED1 ⁺ Monozyten/Makrophagen (%) im Lungengewebe isogener und allogener Transplantate.....	38
Abb. 3-3 ED1 ⁺ M/M in Paraffinschnitten von allogenen DA→LEW und isogenen LEW→LEW transplantierten Rattenlungen.....	40
Abb. 3-4 Flächenanteil ED2 ⁺ Makrophagen (%) im Lungengewebe isogener und allogener Transplantate.....	41
Abb. 3-5 ED2 ⁺ Makrophagen in Paraffinschnitten von allogenen und isogen transplantierten Rattenlungen.....	43
Abb. 3-6 Flächenanteil R73 ⁺ T-Zellen (%) im Lungengewebe isogener und allogener Transplantate.....	44
Abb. 3-7 R73 ⁺ T-Zellen in Paraffinschnitten von allogenen und isogen transplantierten Rattenlungen.....	46
Abb. 3-8 Flächenanteil Ox33 ⁺ B-Lymphozyten (%) im Lungengewebe isogener und allogener Transplantate.....	47
Abb. 3-9 Ox33 ⁺ B-Zellen in Paraffinschnitten von allogenen und isogen transplantierten Rattenlungen.....	49
Abb. 3-10 Zusammenfassende Darstellung der immunpositiven Flächenanteile (%) isogener Transplantate.....	50
Abb. 3-11 Zusammenfassende Darstellung der immunpositiven Flächenanteile (%) allogener Transplantate.....	50
Abb. 3-12 Gegenüberstellung immunpositiver Flächenanteile (%) der rechten nicht transplantierten Empfängerlungen und der isogenen Transplantate.....	51
Abb. 3-13 Gegenüberstellung immunpositiver Flächenanteile (%) der rechten nicht transplantierten Empfängerlungen und der allogenen Transplantate.....	52

6.3 Tabellen

	Seite
Tab. 1-1	Todesursachen nach Lungentransplantation..... 2
Tab. 1-2	Kurzfassung der <i>Revised working formulation for classification and grading of lung allograft rejection</i> [112].... 13
Tab. 2-1	Reagenzien (alphabetisch)..... 16
Tab. 2-2	Materialien (alphabetisch)..... 18
Tab. 2-3	Medikamente (alphabetisch)..... 19
Tab. 2-4	Geräte (alphabetisch)..... 19
Tab. 2-5	Einbettung..... 24
Tab. 2-6	Silanisieren..... 25
Tab. 2-7	Entparaffinieren..... 29
Tab. 2-8	Antikörper..... 30
Tab. 2-9	Hämalaun-Gegenfärbung..... 32
Tab. 2-10	Hämatoxylin-Eosin-Färbung..... 32
Tab. 2-11	Entwässerung..... 33
Tab. 3-1	Histopathologische Veränderungen bei isogenen und allogenen Transplantaten..... 36
Tab. 3-2	Infiltration ED1 ⁺ Monozyten/Makrophagen bei isogenen und allogenen Transplantaten..... 39
Tab. 3-3	Infiltration ED2 ⁺ Makrophagen bei isogenen und allogenen Transplantaten..... 42
Tab. 3-4	Infiltration R73 ⁺ T-Lymphozyten bei isogenen und allogenen Transplantaten..... 45
Tab. 3-5	Infiltration Ox33 ⁺ B-Lymphozyten bei isogenen und allogenen Transplantaten..... 48

7 Anhang

7.1 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. V. Grau, die mir das Thema für diese Arbeit überlassen hat und mich mit Rat und Tat dabei unterstützte. Sie erwies sich als sehr engagierte und hilfsbereite Betreuerin während der Labortätigkeit in Marburg und Gießen. Sie eröffnete mir in freundschaftlicher Weise den Zugang zur wissenschaftlichen Tätigkeit und half mir das komplexe Gebiet der Transplantationsimmunologie zu erschließen. Frau Prof. Dr. V. Grau war für mich eine hervorragende Lehrerin der experimentellen Methoden, der zunächst ungewohnten Labortätigkeit. Sie stand jederzeit bei Problemen und Fragen zur Verfügung. Dafür und für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen nochmals mein gebührender Dank. Frau Prof. Dr. V. Grau etablierte die orthotope Rattenlungen-Transplantation nach der Methode von Mizuta [64] am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg. Hierdurch wurde die vorliegende Arbeit erst möglich.

Frau Prof. Dr. B. Steiniger, Leiterin der Arbeitsgruppe Immunbiologie am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Marburg, danke ich für die Möglichkeit der Durchführung der praktischen Untersuchungen.

Anja Seiler danke ich für die technische Assistenz bei einer Vielzahl von Untersuchungen in Marburg sowie ein immer offenes Ohr bei großen und kleinen Problemen. Ebenfalls danken möchte Renate Plaß für die technische Assistenz in Gießen.

Danken möchte ich auch meinen Eltern sowie meiner Großmutter Anneliese für ihren Glauben an mich während des Studiums. Hervorzuheben ist dabei meine Mutter, die mir in vielen Angelegenheiten des Lebens mit Rat und Tat zur Seite stand und mir und meiner Familie besonders in den letzten beiden Jahren sehr geholfen hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner lieben Frau Birgitt, die mich nach einem langen Arbeitstag ermutigte mich doch noch an den Schreibtisch zu setzen sowie unseren Söhnen Lasse und Jasper, deren Anwesenheit mein Herz erhellen. So manche Stunde hätte ich auch gerne mit ihnen verbracht.

7.2 Ehrenwörtliche Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis niedergelegt sind, eingehalten.“

Bad Hersfeld, den 01.12.2009

Andree Schmidt

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

7.4 Veröffentlichung und Poster

1. **Schmidt A, Sucke J, Fuchs-Moll G, Freitag P, Hirschburger M, Kaufmann A, Garn H, Padberg W, Grau V (2007).** Macrophages in experimental rat lung isografts and allografts: infiltration and proliferation in situ.

Journal of Leukocyte Biology. 81: 186-194.

2. **Schmidt A, Plaß R, Nau U, Padberg W, Grau V (2005).** Acute rejection of experimental lung transplants - time course of graft infiltration by macrophages and T-lymphocytes.

9. Chirurgische Forschungstage, 19.-21. September 2005, Frankfurt a.M.

3. **Schmidt A, Plaß R, Nau U, Padberg W, Grau V (2005).** Acute rejection of experimental lung transplants - time course of graft infiltration by macrophages and T-lymphocytes.

36. Jahrestagung DGfI, September 2005, Universität Kiel

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5472-5



9 1 7 8 3 8 3 5 1 9 5 4 7 2 4